

Az öregedési folyamat és idegi funkciók ivarspecifikus szabályozása genetikai modellszervezetekben

Doktori értekezés

Hotzi Bernadette

Biológia Doktori Iskola,
Iskolavezető: Prof. Erdei Anna DSc, egyetemi tanár

Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program,
Programvezető: Prof. Vellai Tibor DSc, tanszékvezető, egyetemi tanár

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar



Témavezető:

Prof. Vellai Tibor DSc
tanszékvezető, egyetemi tanár
ELTE Genetikai Tanszék

Készült:

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Genetikai Tanszék
Budapest, 2019

Tartalomjegyzék

1. Rövidítésjegyzék	6
2. Bevezetés	11
3. Irodalmi áttekintés	12
3.1. Az öregedés és a viselkedés ivarspecifikus szabályozása <i>C. elegans</i>-ban.....	12
3.1.1. A <i>C. elegans</i> általános jellemzése.....	12
3.1.1.1. A <i>C. elegans</i> ivarspecifikus tulajdonságai.....	15
3.1.2. Szomatikus szex-determináció <i>C. elegans</i> -ban.....	15
3.1.2.1. A TRA-1 szex-determinációs fehérje.....	19
3.1.2.1.1. Ismert TRA-1 célgénék	19
3.1.2.1.2. TRA-1 kötőhelyek a <i>C. elegans</i> genomban.....	20
3.1.2.1.3. Doktori munkám tárgyát képező TRA-1 célgénék.....	21
3.1.3. Az öregedési folyamat	22
3.1.3.1. Az öregedés általános molekuláris jellegzetességei.....	22
3.1.3.2. Az öregedési folyamat szabályozása.....	24
3.1.3.2.1. Az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonál	26
3.1.3.2.1.1. DAF-16/FoXO által szabályozott gének, folyamatok.....	27
3.1.3.2.1.2. A DAF-16/FoXO fehérje inzulin/IGF útvonaltól független szabályozása.....	28
3.1.3.2.1.3. <i>daf-16</i> izoformák <i>C. elegans</i> -ban.....	28
3.1.3.3. Ivarspecifikus öregedés az állatvilágban.....	30
3.1.3.3.1. Az ivarspecifikus élettartam molekuláris modelljei	31
3.1.3.3.2. Ivarspecifikus élettartam <i>C. elegans</i> -ban.....	32
3.1.4. Heterotrimer G fehérjék.....	33
3.1.4.1. A GOA-1 fehérje funkciója.....	34
3.1.5. Ivarspecifikus viselkedés <i>C. elegans</i> -ban	35
3.1.6. A <i>C. elegans</i> idegrendszer ivarspecifikus jellegzetességei.....	36
3.2. Neurodegeneratív folyamatok autofágia-alapú kezelése <i>D. melanogaster</i>-ben.....	39
3.2.1. Öregedés és neurodegeneratív betegségek.....	39

3.2.2. Autofágia-alapú terápiás megközelítések neurodegeneratív betegségek kezelésében	40
3.2.2.1. Az autofágia	40
3.2.2.1.1. Az autofágia főbb típusai és mechanizmusa.....	40
3.2.2.1.2. Autofágia öregedő idegsejtekben	43
3.2.2.1.3. Autofágia-alapú terápiás megközelítések	43
3.2.2.1.4. Autofágiát szabályozó új kismolekulák, AUTEN-67 és AUTEN-99.....	43
3.2.3. <i>Drosophila</i> neurodegeneratív betegség modellek.....	45
3.2.3.1. A <i>Drosophila melanogaster</i> általános jellemzése	45
3.2.3.1.1. Neurodegeneratív betegség modellek <i>Drosophila</i> -ban	46
3.2.4. A Huntington-kór	46
3.2.4.1. A Huntington-kór genetikai háttere.....	46
3.2.4.2. Tünetek és terápiás lehetőségek	47
3.2.4.3. A HTT fehérje	47
3.2.4.4. Mutáns HTT fehérje	48
3.2.4.5. <i>Drosophila</i> HD modellek	49
4. Célkitűzések	50
4.1. Az öregedés és az idegrendszer ivarspecifikus szabályozásának vizsgálata	50
4.2. Neurodegeneratív betegségek kezelése autofágia indukáló gyógyszerjelöltekkel	51
5. Anyagok és módszerek.....	52
5.1. Felhasznált törzsek	52
5.2. <i>C. elegans</i> törzsfenntartás.....	53
5.2.1. Táptalajok	54
5.2.2. Hímek előállítása	55
5.2.3. Embrió preparálás	55
5.3. <i>Drosophila</i> törzsek és fenntartásuk	56
5.4. <i>C. elegans</i> élettartam mérés.....	56
5.5. RNS interferencia (<i>C. elegans</i>).....	57
5.6. Bioinformatikai módszerek	58
5.6.1. Konstrukciók tervezése	58
5.6.2. Konzervált GLI kötőhely keresése a humán <i>FoXO</i> gén genomi régiójába.....	58

5.7. Riporter konstrukciók készítése (<i>C. elegans</i>)	58
5.8. Transzgenikus <i>C. elegans</i> törzsek előállítása	64
5.9. Fluoreszcens mikroszkópia (<i>C. elegans</i>)	65
5.10. Transzkript szintek meghatározása kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) és szemi-kvantitatív PCR (szemi-q-PCR) segítségével (<i>C. elegans</i>)	66
5.11. Kromatin immunoprecipitáció (ChIP) <i>C. elegans</i> -on.....	68
5.12. Hatóanyag-kezelések <i>D. melanogaster</i> -ben	71
5.13. Western blot analízis (<i>C. elegans</i> és <i>D. melanogaster</i>)	71
6. Eredmények és értelmezésük	74
6.1. Az élettartam ivarspecifikus szabályozása <i>C. elegans</i>-ban	74
6.1.1. TRA-1 kötőhelyek a <i>daf-16</i> genomi régióban	74
6.1.2. Hermafrodita túlsúllyal rendelkező populációkban a hermafroditák tovább élnek a hímeknél.....	75
6.1.3. Insulin/IGF-1 jelátvitel defektív mutánsokban a hermafroditák hosszabb élettartama DAF-16/FoXO-függő.....	76
6.1.4. A TRA-1 hat a hermafroditák élettartamára	77
6.1.5. A TRA-1 élettartam növelő hatása DAF-16-függő	78
6.1.6. A TRA-1 <i>in vivo</i> köt a <i>daf-16</i> szabályozó régiójában talált konzervált kötőhelyhez	78
6.1.7. Hermafroditákban a TRA-1 közvetlenül serkenti a <i>daf-16d/f</i> izoforma expresszióját	81
6.1.8. A TRA-1 a talált kötőhelyen át serkenti a <i>daf-16d/f</i> expresszióját.....	82
6.1.9. Egy funkcionális <i>daf-16d/f</i> riporter transzgén jobban kifejeződik hermafroditákban és nagyobb mértékben növeli az élettartamot, mint hímekben.....	83
6.1.10. Egy konzervált GII kötőhely a human <i>FoXO3</i> génben	85
6.2. Idegrendszeri funkciók ivarspecifikus szabályozása <i>C. elegans</i>-ban.....	86
6.2.1. Konzervált TRA-1 kötőhely a <i>goa-1</i> génben.....	86
6.2.2. A TRA-1 közvetlenül gátolja a <i>goa-1</i> transzkripcióját felnőtt hermafroditákban ..	86
6.2.3. A TRA-1 fehérje a meghatározott kötőhelyen át gátolja a <i>goa-1</i> expresszióját embriókban	87
6.2.4. A GOA-1 szerepet játszhat az idegrendszer szex-specifikus fejlődésében.....	90
6.3. Autofágia aktiváló kismolekulák vizsgálata a Huntington kór egy <i>D. melanogaster</i> modelljében	93

6.3.1. Az AUTEN-67 és AUTEN-99 kismolekulák gátolják a neurodegeneratív tünetek kialakulását <i>Drosophila</i> HD modellben.....	93
6.3.2. Az AUTEN-67 több ponton is serkenteni az autofág aktivitást egy <i>Drosophila</i> HD modellben.....	94
6.3.3. Az AUTEN-99 serkenti az autofág aktivitást egy <i>Drosophila</i> HD modellben.....	97
7. Következtetések	98
7.1. Az élettartam és idegrendszeri funkciók ivarspecifikus szabályozását <i>C. elegans</i>-ban a szex-determinációs génkaskád irányítja	98
7.1.1. A TRA-1 a <i>daf-16</i> transzkripcionális szabályozásán keresztül hat az élettartamra	98
7.1.2. A TRA-1 a <i>goa-1</i> transzkripcionális szabályozásán keresztül befolyásolja a viselkedést és az idegrendszer fejlődését	100
7.1.3. A feltárt szabályozási kapcsolatok lehetséges szerepe emberben.....	103
7.2. Az AUTEN-67 és -99 kismolekulák potenciális terápiás hatóanyagok neurodegeneratív betegségek kezeléséhez	105
7. Összefoglalás	108
8. Summary	109
9. Irodalomjegyzék	110
10. Függelék	121
11. Köszönetnyilvánítás	129

1. Rövidítésjegyzék

128Q-HTT	128 db Q (glutamin) ismétlést tartalmazó humán Huntingtint (HTT) kifejező transzgénikus <i>Drosophila</i> vonal (HD modell)
16Q-HTT	16 db Q ismétlést tartalmazó humán HTT-t kifejező transzgénikus <i>Drosophila</i> vonal („egészséges” kontroll a HD modellhez)
AA	diploid autoszóma szett
Ab	<i>antibody</i> (antitest)
a, b, d/f/h	különböző <i>daf-16</i> izoformák
age	ageing (öregedés)
Akt	AKT kinase family (AKT kináz család)
AMP	<i>adenosine monophosphate</i> (adenizin monofoszfát)
Amp	ampicillin
AMPK	<i>5' AMP-activated protein kinase</i> (5' AMP-aktivált protein kináz)
ase	<i>autosomal signal elements</i> (autoszómális, ún. denominátor gének)
Atg	<i>autophagy-related</i> (autofágia kapcsolt)
AUTEN	<i>autophagy enhancer</i> (autofágia fokozó kismolekula)
AWA	<i>amphid wing cell</i> (amphid neuron)
biDW	kétszer desztillált víz
bp	bázispár
C terminális	fehérje karboxil láncvég
<i>C. briggsae</i>	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CAG	glutamint kódoló triplet
Cas9	<i>CRISPR-associated protein 9</i> (CRISPR-kapcsolt fehérje 9)
cDNS	<i>complementary DNA</i> (kiegészítő DNS)
<i>ceh</i>	<i>C. elegans</i> homeobox
CEM	<i>male specific cephalic neuron</i> (hím-specifikus feji neuron)
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i> (Nemzetközi <i>C. elegans</i> törzsgyűjtemény)
ChIP	<i>chromatin immunoprecipitation</i> (kromatin immunoprecipitáció)
Ci	<i>cubitus interruptus</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> (rövid palindrom ismétlődések klasztere)
CUL	<i>Cullin</i>
<i>daf</i>	<i>abnormal dauer formation</i> (abnormális dauer lárva fejlődés)

DAG	<i>diacylglycerol</i> (diacilglicerol)
DBE	<i>DAF-16 binding element</i> (DAF-16 kötőhely)
DEPC-es víz	<i>diethylpyrocarbonate</i> (detilpirokarbonát) kezelt, nukleáz mentes víz
DGK	<i>DAG kinase</i> (DAG kináz)
DH5α	<i>E. coli</i> törzs (molekuláris klónozás során használt speciális törzs)
dmd	<i>DM (Doublesex/MAB-3) domain family</i> (DM domén család)
dNTP	<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i> (dezoxiribonukleotid-trifoszfát)
DR	<i>dietary restriction</i> (étrend korlátozás)
ds	<i>double-stranded</i> (duplaszálú)
Dpy	<i>Dumpy</i> (rövid, zömök)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTP	<i>egg-derived tyrosine phosphatase</i> (petéből származó tirozin foszfatáz)
egl	<i>egg-laying defective</i> (embrió lerakás-deficiens)
ER	<i>endoplasmic reticulum</i> (endoplazmatikus retikulum)
ev	<i>empty vector</i> (üres vektor)
fem	<i>feminization of XX and XO animals</i> (XX és XO állatok is nőstényként fejlődnek)
Fip200	<i>focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD</i> (200 kD fehérjével kölcsönható kináz család)
fog	<i>feminization of germline</i> (csíravonal feminizáló)
FoXO	<i>forkhead box O transcription factor</i> (Forkhead-box O típusú transzkripció faktor)
FTT	<i>Fourteen-Three-Three family</i> (14-3-3 család)
FudR	<i>5-fluoro-2'-deoxyuridine</i> (5-fluoro-2'-dezoxiuridin)
FW primer	<i>forward</i> (előre haladó) primer
G fehérjék	<i>guanosine triphosphate binding protein</i> (guanozin-trifoszfát-kötő fehérje)
GAL4	<i>galactose-responsive transcription factor 4</i> (galaktóz indukálható transzkripció faktor 4)
GDP	<i>guanosine diphosphate</i> (guanozin-difoszfát)
GEF	<i>guanine-nucleotide exchange factor</i> (guanin-nukleotid kicserélő faktor)
gf	<i>gain-of-function</i> (funkciónyerés)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (zöld fluoreszcens fehérje)
Gi/o/α	heterotrimer G fehérjék gátló típusú α alegysége
GLI	<i>glioma-associated oncogene protein</i> (Glioblasztóma-asszociált fehérje)
GOA-1	<i>G protein, O, Alpha subunit</i> (G fehérje O, alfa alegység)

GPA	<i>G Protein, Alpha subunit</i> (G fehérje, alfa alegység)
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> (G fehérje kapcsolt receptor)
GPR	<i>G protein regulator</i> (G fehérje szabályozó)
GTP	<i>Guanosine-5'-triphosphate</i> (guanozin-5'-trifoszfát)
Gα, Gβ és Gγ	G fehérje alegységei (alfa, béta, gamma)
HD	<i>Huntington's disease</i> (Huntington-kór)
her	<i>hermaphrodization of XO animals</i> (XO állatok hermafroditaként fejlődnek)
Hh	<i>Hedgehog</i>
him	<i>high incidence of males</i> (hímeket nagy százalékban szegregáló)
HSF	<i>heat shock factor</i> (hőshock transzkripció faktor)
HSN	<i>hermaphrodite-specific motor neuron</i> (hermafrodita specifikus motor neuron)
HT115	<i>E. coli</i> törzs (RNSi vizsgálatok során alkalmazott speciális törzs)
HTT	Huntingtin fehérje
IF	<i>intermittent fasting</i> (időszakos böjt)
IGF	<i>insulin-like growth factor</i> (inzulinszerű növekedési faktor)
IGFR	IGF receptor
IgG	immunglobulin G
IL	<i>insulin-like peptid</i> (inzulinszerű peptid)
IPTG	<i>isopropyl-β-D-thio-galaktopyranoside</i> (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid)
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> (C-Jun N-terminális kináz)
kb	kilóbázis
KFERQ	lizin-fenilalanin-glutamát-arginin-glutamin pentapeptid motívum
L1, L2, L3, L4	<i>C. elegans</i> lárvák stádiumok
LB	Luria-Broth táptalaj
LC3	<i>light chain 3</i> (könnyű lánc kináz 3)
lf	<i>loss-of-function</i> (funkció vesztesés)
Lin	<i>abnormal cell lineage</i> (abnormális sejtleszármazás)
Mab	<i>male abnormal</i> (abnormális hím morfológia)
MCM	<i>mystery cells of the male</i> (hím specifikus feji neuron)
mRNS	<i>messenger RNA</i> (hírvivő RNS)
MTM	<i>myotubularin</i>
MTMR	<i>myotubularin-related</i> (myotubularin-szerű)
mTOR	<i>mammalian/mechanistic target of rapamycin</i> (a Rapamycin emlős kináz célpontja)

mtsi.	munkatársai
N terminális	fehérje amino láncvég
N2	vad-típusú <i>C. elegans</i> törzs
NA22	<i>E. coli</i> törzs (<i>C. elegans</i> táplálására használható speciális törzs)
NGM	<i>nematoda growth medium</i> (Nematoda táptalaj)
Odr	<i>odorant response abnormal</i> (szaganyagokra adott válasz rendellenes)
OP50	<i>E. coli</i> törzs (<i>C. elegans</i> táplálására általánosan használt baktérium törzs)
p150	a PI3KC3 komplex szabályozó alegysége (Vps105 ortológ)
p62	autofágia szubsztrát 62 kDa fehérje (SQSTM-1 - <i>sequestosome</i> – ortológ 1)
PA	<i>phosphatidic acid</i> (foszfátidinsav)
Par	<i>abnormal embryonic partitioning of cytoplasm</i> (citoplazma alkotók abnormális eloszlása)
PCR	<i>polymesase chain reaction</i> (polimeráz láncreakció)
PD	<i>Parkinson's disease</i> (Parkinson-kór)
PDF	<i>pigment dispersing factor</i> (pigment diszpergáló faktor)
PDK-1	<i>PDK-class protein kinase</i> (PDK család protein kináz)
PHB	<i>phasmid neuron</i> (fazmid neuron)
PI	<i>phosphatidylinositol</i> (foszfátidilinozitol)
PI3,5P₂	<i>phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate</i> (foszfátidilinozitol-3,5-biszfoszfát)
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> (foszfátidilinozitol 3-kináz)
PI3KC3	<i>phosphatidylinositol 3-kinase class 3</i> (III típusú foszfátidilinozitol 3-kináz)
PI3P	<i>phosphatidylinositol 3-phosphate</i> (foszfátidilinozitol-3-foszfát)
PIP₂	<i>PI4,5P₂, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> (foszfátidilinozitol-4,5-biszfoszfát)
PIP₃	<i>PI3,4,5P₃, Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate</i> (foszfátidilinozitol-3,4,5-triszfoszfát)
PLCβ	<i>phospholipase Cβ</i> (foszfolipáz Cβ)
polyQ	poliglutamin
PQM-1	<i>paraquat (methylviologen) responsive</i> (Parakvatra válaszoló)
qRT-PCR	<i>quantitativ real time PCR</i> (valós idejű kvantitatív PCR)
rf	<i>reduction-of-function</i> (funkció csökkenéses)
RGS	<i>regulator of G protein signalling</i> (G fehérje jelátvitel szabályozója)
Ric	<i>resistance to inhibitors of cholinesterase</i> (koleszteráz gátlókra rezisztens)
RNSi	<i>RNA interference</i> (RNS interferencia)

ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktív oxigénszármazékok)
rpm	<i>round per minute</i> (kör/perc, fordulatszám)
RV primer	<i>reverse primer</i> (fordított irányú primer)
Sdc	<i>sex-determination and dosage compensation defective</i> (rendellenes szex-determináció és dóziskompenzáció)
SGK	<i>serum and glucocorticoid inducible kinase homolog</i> (szérum és glükokortikoid indukálható kináz homológ)
SIRT1	<i>sirtuin 1</i>
SKN-1	<i>skinhead-1</i>
SOB	<i>super optimal broth</i> (szuper optimális tápleves)
sqPCR	szemi-kvantitatív PCR
sry	<i>sex-determining gene on the Y chromosome</i> (az Y kromoszóma ivar meghatározó génje)
TALEN	<i>three amino acid loop extension</i> (homeodomént kódoló konzervált szekvenciárészlet)
Tetr	tetraciklin
TGFβ	<i>transforming growth factor-β</i> (transzformáló növekedési faktor- β)
TOR	<i>target of rapamycin</i> (Rapamicin kináz célpontja)
Tra	<i>transformer</i> (XX kariotípusú állatok hímként fejlődnek)
tra-1a és b	hosszabb és rövidebb <i>tra-1</i> izoformák
UAS	<i>upstream activating sequence</i> (upstream aktiváló szekvencia)
Ulk1	<i>UNC-51-like kinase</i> (UNC-51-szerű kináz)
Unc	<i>uncoordinated</i> (mozgásképtelen)
UTR	<i>untranslated region</i> (nem transzlálódó szabályozó régió)
VC	<i>ventral cord motor neuron</i> (ventrális köteg motor neuron)
Vps34	<i>vacuole protein sorting factor 34</i> (vakuólum szállító faktor 34)
XO	1 db X kromoszómát tartalmazó kariotípus
xol-1	<i>XO lethal</i> (XO állatok életképtelenek)
xse	<i>X signal elements</i> (X kromoszómán található ún. numerátor - számláló - gének)
XX	2 db X kromoszómát tartalmazó kariotípus

2. Bevezetés

Doktori munkám során az öregedési folyamat, valamint különböző idegrendszeri funkciók szex-specifikus szabályozását vizsgáltam a fonalféreg *Caenorhabditis elegans* és az ecetmuslica *Drosophila melanogaster* genetikai modellszervezetekben. Az öregedés egy komplex biológiai folyamat, amelynek rátáját számos gén aktivitása befolyásolja. Az öregedés során fokozatosan csökken a sejtek és szervek integritása és funkciója. Ennek eredményeként az élőlény egyre kevésbé lesz ellenálló a környezeti hatásokkal szemben, így megnő a kockázata számos betegség (pl. rák, neurodegeneratív betegségek, szöveti fibrózis és atrófia, cukorbetegség és immundeficiencia) kialakulásának, majd az élőlény pusztulásának. Az elmúlt 200 évben az általános életkörülmények és az egészségügyi ellátás javulása eredményeként világszerte nőtt az emberek átlagos élettartama. Az öregedési folyamat tanulmányozásának tehát jelentős gazdasági és társadalmi hatásai lehetnek. Éppen ezért az öregedési folyamat szabályozásának és mechanizmusának megértése jelenleg a biológia egyik legfontosabb kutatási területe. Az öregedési folyamat egyik érdekes aspektusa, hogy szinte minden szexuálisan dimorf állatfajban különbözik a két eltérő nem élettartama. Ide tartozik az ember is; jelenleg a nők átlagos élettartama 5-7 évvel haladja meg a férfiakét. Hasonló nemi különbségek figyelhetők meg az öregedési betegségek kialakulásában és a kezelésekre adott reakciókban is.

A *C. elegans* és *D. melanogaster* modellszervezetek az öregedési és idegrendszeri kutatások kedvelt objektumai. Ezekben az élőlényekben az alapvető biológia jelenségeket viszonylag gyorsan és könnyen lehet vizsgálni. Élettartamuk rövid, idegrendszerük pedig viszonylag egyszerű, így a molekuláris szintű változások jól vizsgálhatók bennük.

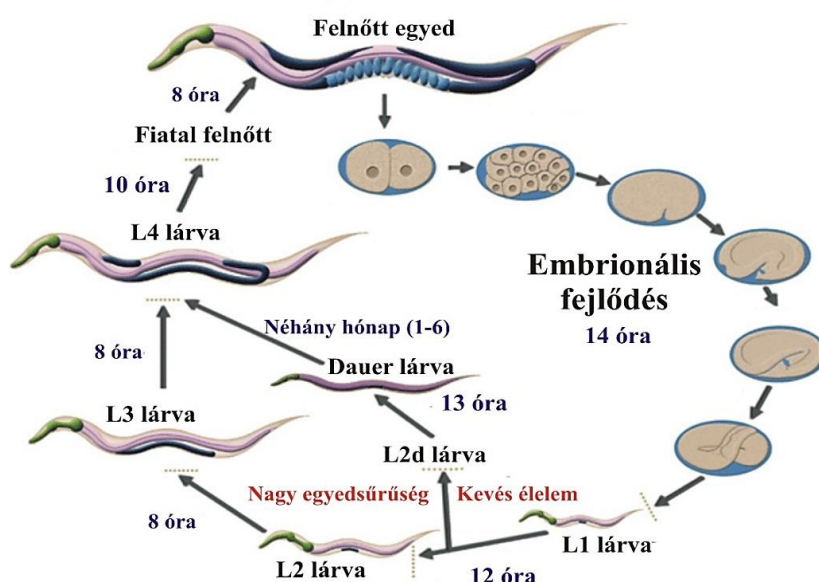
Kutatásom során két olyan szabályozási kapcsolatot vizsgáltam *C. elegans*-ban (a szex-determinációs génkaszkádnak és az inzulin/IGF1 jelátviteli útvonal kapcsolata, illetve a szex-determinációs génkaszkádnak és a heterotrimerikus G fehérje jelátviteli útvonal kapcsolata), melyek magyarázatot adhatnak a nemek közt megfigyelhető élettartam és viselkedési különbségekre. A feltárt szabályozási kapcsolatok magasabb rendű állati taxonokban is jelen lehetnek. Ugyancsak bekapcsolódtam neurodegeneratív betegségek *Drosophila* modellekben történő vizsgálatába. Két olyan kismolekulát teszteltem ecetmuslicában, melyek potenciális autofágia indukáló terápiás gyógyszerjelöltékké válhatnak a jövőben.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az öregedés és a viselkedés ivarspecifikus szabályozása *C. elegans*-ban

3.1.1. A *C. elegans* általános jellemzése

A *C. elegans* egy mérsékelt övben általánosan előforduló, talajban szabadon élő fonalféreg (Nematoda) faj. Az állat a rothadó növényi részek körül felhalmozódó baktériumokkal táplálkozik. 1963-ban Sydney Brenner vezette be a genetikai kutatásokba, elsősorban a fejlődést szabályozó genetikai útvonalak és az idegrendszer vizsgálatára. Mára az egyik legszélesebb körben alkalmazott genetikai modellrendszeré vált^{1,2}.



1. ábra. A *C. elegans* életciklusa 22°C-on. Egyedfejlődése a peteburkon belüli embrionális stádiumokból és az azt követő 4 lárvastádiumból (L1-4) áll. Kedvezőtlen körülmények között az L1 lárva képes egy alternatív fejlődési útvonalra lépni, és ún. dauer (kitartó) lárvává alakulni. (Altun és Hall, 2009, módosítva^{3,4})

A *C. elegans* mérete viszonylag kicsi, a felnőtt állatok körülbelül 1,2 mm hosszúak. Életciklusa gyors, 25°C-on körülbelül 3 nap alatt fejlődik ki (1. ábra), és átlagosan 14 napig él. Rövid élettartama miatt az öregedési kutatások egyik legkedveltebb modellszervezete. A természetes populációk zömmel hermafrodita egyedekből állnak, amelyek petesejteket és spermiumokat egyaránt képesek termelni, és önmegtermékenyítéssel szaporodnak. A populációkban azonban kis százalékban (<0,2%) hím egyedek is előfordulnak (2. ábra). A hermafroditák önmegtermékenyítésével a tiszta genetikai vonalak fenntartását, míg a hímekkel

történő keresztezéssel a vonalak kombinációját (többszörös mutáns törzsek létrehozása) lehet megvalósítani. Az embriók körülbelül 30 sejtjes állapotban (korai gasztrula állapot) kerülnek ki a külvilágba. Négy lárvastádiumon (L1-L4) át fejlődnek, melyeket vedlések választanak el egymástól^{1,5}. Létezik egy speciális lárvastádium is, az ún. dauer lárvastádium (1. ábra). Erre az alternatív fejlődésútvonalra rossz körülmények közt (pl. kevés tápanyag, magas hőmérséklet, nagy egyedsűrűség) lép a fejlődő állat. A dauer lárvastádium anatómiai és fiziológiai tulajdonságai arra specializálódtak, hogy az állat túlélje a kedvezőtlen körülményeket, majd a környezeti feltételek javulása esetén vissza tudjon térni a normális életsiklusba^{1,6}.



2. ábra. Felnőtt hermafrodita és hím *C. elegans* párzás közben. A hermafrodita jóval nagyobb a hímnél. A hermafroditák egy rövid spermiumtermelési fázist leszámítva nőtényeknek tekinthetők. Bal oldalt egy lárvastádium látható. (Lints és Hall, 2009⁷)

A *C. elegans* teste mikroszkóp alatt áttetsző, így fénymikroszkóppal egyedi sejt-szinten vizsgálható az állat egyedfejlődése és anatómiája. A sejtek leszármazása egyedülként a ma ismert modellrendszerek között invariáns. Ezeket a tulajdonságait kihasználva a kutatók meghatározták az állat minden egyes sejtjének leszármazási vonalát⁸. A felnőtt állat testfelépítése viszonylag egyszerű, közel 1000 szomatikus sejtből áll (hermafroditák: 959, hímek: 1031)^{1,9}.

A hermafroditák 5 pár autoszómával (A) és egy pár ivari (X) kromoszómával rendelkeznek (XX kariotípus), míg a hímeknek csak egy X kromoszómájuk van (XO kariotípus). A hermafroditák ivarsejtképzése során minden ivarsejt egy X kromoszómát tartalmaz, és megtermékenyítéskor így jön létre a XX kariotípusú állat, mely hermafroditává fejlődik. Meiózis során az X kromoszómák szét nem válása miatt létrejöhetnek olyan ivarsejtek, melyek nem tartalmazzak X kromoszómát (O), így a megtermékenyítés során XO kariotípusú állatok képződhetnek, melyek hím állatként fejlődnek. Az ilyen esetekben ugyancsak

létrejövő XXX kariotípusú állatok nem életképesek. Ez a spontán és igen ritkán bekövetkező esemény magyarázza a hímek alacsony számát, de egyes mutációk és bizonyos környezeti körülmények növelhetik kialakulásuk esélyét¹.

A hermafroditák csíravonalában L3 stádiumban kezdődik meg az ivarsejtképzés, ekkor spermiumok kezdenek el termelődni, melyek elraktározódnak a spermatékában. Az L4 lárva stádium végén váltás történik a csíravonalban, és már csak petesejtek termelődnek, melyeket önmegtermékenyítés esetén az elraktározott spermiumok termékenyítenek meg. A hímeknél az L4 lárva stádium közepén indul meg a spermium termelés¹⁰. Hímekkel való párzás esetén a hímek spermiumai kiszorítják a hermafroditák saját spermiumait, így az utódok 100%-a a hím leszármazottja lesz. Hímekkel való párzást követően 50-50% arányban hím és hermafrodita utódok keletkeznek, mivel a hímek ivarsejtjei között 50% az X kromoszómát nem tartalmazó spermiumok aránya. A hermafroditák önmegtermékenyítéssel átlagosan 300 utódot hoznak létre, míg a hímekkel való párzás eredményeként akár 1000 embriót is képesek lerakni. A hermafroditák jóval több petesejttel rendelkeznek, mint spermiummal, így a saját spermium raktárak kimerülése után még jó ideig termékenyek, csak már önmegtermékenyítésre nem képesek¹.

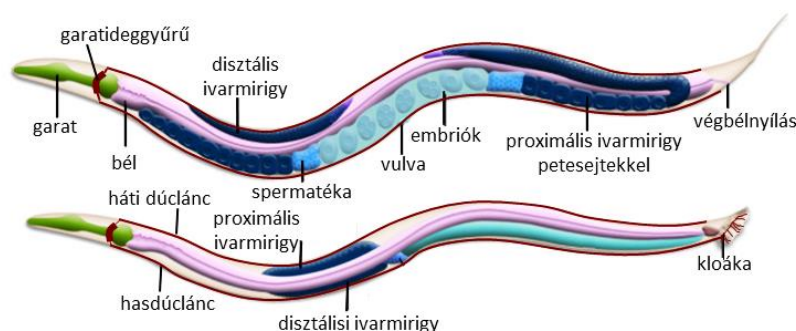
Az állatok L1 lárva állapotban lefagyaszthatók és így több évig eltárolhatók -80°C-on vagy folyékony N₂-ben. Ez megakadályozza, hogy felszaporodjanak bennük mutációk¹. A *C. elegans* volt az első többsejtű élőlény, amelynek teljes genomját megszekvenálták és elérhetővé tették¹¹. Az állatnak kb. 20 000 fehérje-kódoló génje van, és a humán gének 60-80%-nak van *C. elegans* ortológja. Mára a legtöbb *C. elegans* gén esetében rendelkezünk mutáns allélokkal, melyek szabadon hozzáférhetők a törzsközpontban (*Caenorhabditis Genetics Center*). A klasszikus mutagenézis technikák mellett az utóbbi időkben több célzott genom-szerkesztési eljárást (TALEN, CRISPR/Cas9) is megvalósítottak a *C. elegans* esetében. Ezek mellett a modellszervezet nagy előnye, hogy igen hatékonyan és könnyen lehet benne géneket csendesíteni RNS interferencia (RNSi) segítségével^{1,12-14}. Mára több rokon *Caenorhabditis* faj genomja is elérhetővé vált, mely lehetővé teszi az összehasonlító evolúciós vizsgálatokat^{1,15}.

A *C. elegans* kutatások eredményeit állandóan frissülő, interneten könnyen elérhető adatbázisok foglalják össze¹. Ezek közül a három legjelentősebb a főleg genetikai

információkat összefoglaló WormBase (wormbase.org), a féreg anatómiájával kapcsolatos ismereteket összegyűjtő Wormatlas (wormatlas.org), és a fejlődéstani és sejtbiológiai vizsgálatok eredményeit tartalmazó WormBook (wormbook.org).

3.1.1.1. A *C. elegans* ivarspecifikus tulajdonságai

A *C. elegans* kiváló modellszervezet a nemi különbségeket kialakító genetikai háttér vizsgálatára, hiszen számos ivari különbség figyelhető meg a hermafroditák és hímek között anatómiai, élettani és viselkedési szinten egyaránt. A két nem jelentősen eltér testfelépítésében (3. ábra). Nemi különbségek megfigyelhetők specifikus szervek, szövetek formájában (pl. párzószervek), vagy egy mindkét nemben megtalálható szerv anatómiai különbségeiben (pl. a neuronok között ivarspecifikus kapcsolati hálózat fejlődik ki). A jelentősebb ivari különbségek elsősorban posztembrionálisan alakulnak ki^{16,17}. A két nem egyedfejlődési folyamata markáns különbségeket mutat¹⁸. Az anatómiai és fejlődési eltérések mellett különbséget figyeltek meg a nemek élettartamában^{19–25}, stressztűrésében²⁶, párzó viselkedésében, érzékelésében, és tanulási képességében egyaránt^{17,27–31}.

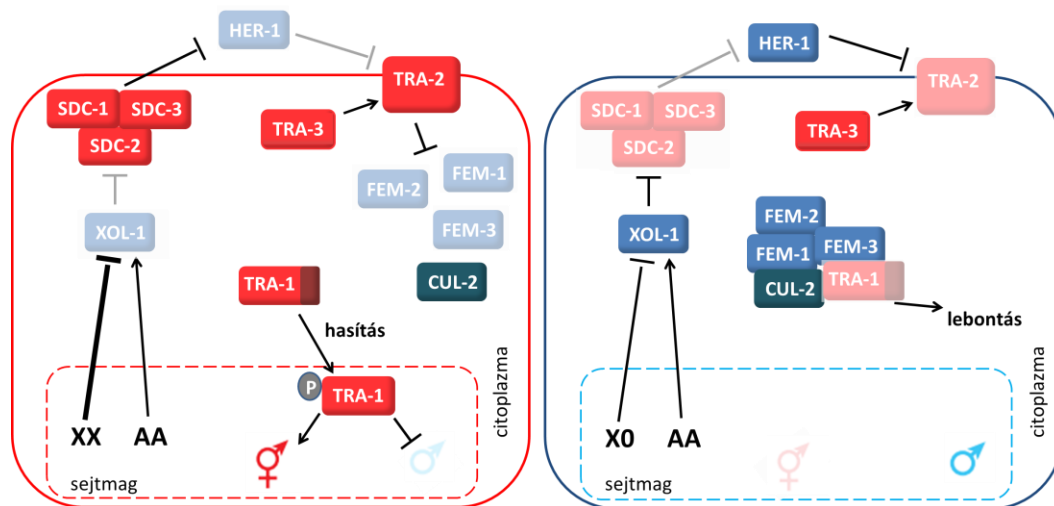


3. ábra. A *C. elegans* hermafrodita és hím egyedek testfelépítése Csupán néhány olyan szövet van (pl. garat és kiválasztó rendszer), amelyben nincs ivarspecifikus különbség. (Emmons, 2005¹⁷ nyomán módosítva.)

3.1.2. Szomatikus szex-determináció *C. elegans*-ban

C. elegans-ban az ivar elsődleges meghatározója az X kromoszómák és az autoszómák szettjének aránya. Vad-típus esetén az XX kariotípusú állatok hermafroditává ($XX/AA=1$), az XO kariotípusú állatok hímmé ($X/AA=0,5$) fejlődnek. Az úgynevezett globális szomatikus szex-determinációs génkaszkád (továbbiakban szex-determinációs génkaszkád) biztosítja,

hogy a féreg minden sejtje a kromoszómális ivarnak megfelelő nemi jellegek szerint fejlődjön ki³¹ (4. ábra). Az útvonal kezdeti szakasza részt vesz a dóziskompensáció kialakításában is (célja, hogy az X kromoszómán lokalizált gének expressziója azonos szintű legyen a két nemben). Lényegében ugyanez a jelátviteli útvonal szabályozza a szex-determinációt a csírvonalban is¹⁰. Mivel azonban a hermafroditáknál van egy rövid spermiumtermelési időszak, így bennük további szabályozó faktorokra van szükség^{10,32}.



4. ábra. A *C. elegans* szomatikus szex-determinációs génkaszkád hermafroditákban és hímekben Az ivar elsődleges meghatározója az X kromoszómák és autoszómák szettjének aránya. A szomatikus szex-determinációs útvonal biztosítja, hogy a sejtek a kromoszómális nemnek megfelelő ivari jellegeket vegyék fel. Az X kromoszómák (X) és autoszómák (A) aránya határozza meg, hogy az útvonal első tagja, a XOL-1 inaktív (hermafrodita, bal oldal) vagy aktív (hím, jobb oldal) állapotú legyen. A XOL-1-et követő *downstream* tagoknak (a hermafroditákban aktív SDC fehérjéknek) szerepük van a dóziskompensációban is (az ábrán nincs jelölve). A HER-1 egy szekretált fehérje, ami biztosítja, hogy minden sejt azonos nemi identitást vegyen fel az állatban. Az útvonal TRA-2 utáni szakasza már sejtautonóm, ha ebben a szakaszban történik mutáció, az csak az adott sejt (illetve leszármazottjainak) nemi identitását befolyásolja. Hímekben a FEM fehérjék a CUL-2 fehérjével egy ubiquitin komplexet alkotnak, mely lebontásra jelöli ki a TRA-1-et. Hermafroditákban a TRA-1-ből C-terminálisan hasított aktív foszfoizoforma keletkezik, mely a sejtmagba jutva transzkripciós faktorként gátolja a hím-specifikus gének átírását, így hermafrodita fejlődési irányt biztosít a sejtnak. Nyíl: serkentés; talpas nyíl: gátlás; fekete: aktív; szürke: inaktív; piros háttérű fehérjék: hermafrodita fejlődési irányt biztosítanak; kék háttérű fehérjék: hím fejlődést biztosítanak; élénk háttérű fehérjék: aktívak; pasztel háttérű fehérjék: inaktívak; P: foszforiláció.

A szex-determinációs génkaszkád első eleme a *xol-1* (*XO lethal*), melynek aktivitását az X kromoszómák és autoszómák szettjének aránya (XX:AA vagy XO:AA) határozza meg. Az X kromoszómán található ún. numerátor (számláló) gének (*XSEs* – *X signal elements*) gátolják,

míg az autoszomális ún. denominator (nevező) gének (*ASEs* – *autosomal signal elements*) serkentik a *xol-1* aktivitását (4. ábra). Hermafroditákban, amelyekben az X kromoszómán található gének aránya magas ($2X/2A=1$), a *xol-1* inaktív. Hímekben, ahol az arány alacsony ($1X/2A=0,5$), a *xol-1* aktív. Ez egy nagyon érzékenyen működő genetikai kapcsoló rendszer, amely aneuploid mutánsokban akár a 0,67 (XX/AAA) és 0,75 (XXX/AAAA) értékeket adó X/A hányados között is különbséget tud tenni (0,67 – hím; 0,75 – hermafrodita)³².

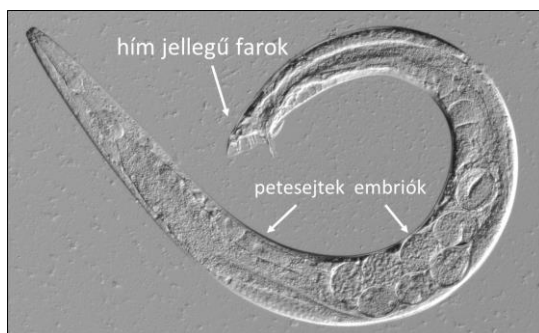
Az útvonal következő és egyben utolsó olyan tagjai, melyek még a dóziskompensációban is szerepet játszanak, az *sdc* (*sex determination and dosage compensation defective*) gének: *sdc-1*, -2 és -3. Mindhárom géntermék két, nagyrészt hasonló tagokból álló komplex felépítésében vesz részt. Az egyik komplex a *C. elegans* dóziskompensációs komplex, mely hermafroditákban mindkét X kromoszóma aktivitását felére csökkenti, így alakítva ki az egyenlő mértékű génexpressziót a hímek egyetlen X kromoszómájával. A másik komplex a szex-determinációs génkaskád következő tagjának, a *her-1*-nek (*hermaphrodization of XO animals*) az expresszióját gátolja (kb. huszad részére csökkenti). A két komplex egyetlen tagban különbözik, de az azonos fehérjék aktivitása is különbségeket mutat a komplexek között^{32,33}. Míg az SDC-k a dóziskompensációban és a szex-determinációban is központi szerepet töltenek be, addig a komplexek többi tagját nem tekintjük a szex-determinációs útvonal részének, hiszen hiányuk nem okozza az állat nemének megváltozását, ellentétben az SDC fehérjékkel. Az SDC-komplexek szex-specifitását az SDC-2 fehérje adja, melyet hímekben a XOL-1 gátol. Hímekben az útvonal következő tagja (HER-1) is aktív^{32,33}.

A HER-1 egy kis szekretált fehérje, mely a hím testének kialakulását támogatja nem-sejtautonóm módon (4. ábra). A szabályozás ezen lépése egy további biztosíték arra, hogy az állat összes sejtje azonos nemi identitás szerint fejlődjön. Az útvonal további tagjainak működése már sejtautonóm. A hímekben a HER-1 egy transzmembrán fehérje, a TRA-2A (*sexual transformer*) extracelluláris doménjéhez kapcsolódik. A fehérje-fehérje interakció következtében a TRA-2A intracelluláris doménje nem képes tovább kötni és gátolni a FEM-3 és FEM-2 fehérjéket. A TRA-2A és FEM (*feminization of XX and XO animals*) fehérjék aktivitásának szabályozásában más fehérjék is szerepet játszanak, például a TRA-3, amely a TRA-2A megfelelő működéséhez szükséges³².

Hímekben a gátlás alól felszabaduló FEM fehérjék (FEM-1, -2 és -3) a CUL-2-vel (*cullin*) egy ubiquitin-ligáz komplexet alkotnak. Ez a komplex felismeri az útvonal utolsó tagjának, a

TRA-1-nek az N-terminális régióját, és proteaszómális lebontás felé irányítja a fehérjét. A TRA-1 felismerésében a FEM-1-nek van kulcsszerepe, a FEM-2 és FEM-3 kofaktorként vesznek részt a folyamatban³⁴. Hermafroditákban a FEM-ek működése gátolt, így a TRA-1-ből C-terminálisan hasított foszfoizoforma keletkezik, mely egy hermafrodita-specifikus transzkripciós faktorként működik (gátolja a hímspecifikus gének kifejeződését)^{32,34,35}.

A fentiek alapján jól látható, hogy a szex-determinációs útvonal mutációi szétkapcsolják a kromoszómális nemet és a szomatikus sejtek nemi sorsát egymástól¹⁷. Ezek a mutációk megváltoztathatják az állat nemét, vagy a nemi jellegzetességek módosulását okozhatják. *tra-1(lf: loss-of-function)* funkcióvesztéses mutáns XX (kromoszómálisan hermafrodita) állatok például hímekké fejlődnek, míg a *fem-3(lf)* vagy *tra-1(gf: gain-of-function)* funkciónyeréses mutáns XX és XO (kromoszómálisan hím) állatok nőténységként fejlődnek. A nőtény szomatikus felépítése azonos a hermafroditáéval, csupán nem termel spermiumot. A funkciócsökkenéses (*rf: reduction-of-function*) mutációk köztes, ún. interszex fenotípust hozhatnak létre, melyek a mutáció típusától függően változatos tulajdonságokat eredményeznek a hím és hermafrodita/nőtény fenotípusok közötti skálán. A *tra-1(e1488) rf* mutáció hatására például az XX állatok olyan interszex állatokká fejlődnek, melyekben a test nagy része hím fenotípust mutat (hím jellegű farok, idegrendszer, nincs vulvaszövet), de a bél és az ivarmirigy hermafrodita jellegű marad (5. ábra). A bélben például termelődik a peték képzéséhez szükséges hermafrodita-specifikus szikanyag. Ivarmirigyük is hermafrodita felépítésű és funkciójú, így az állatok nagy része önmegtermékenyítésre képes³⁶.



5. ábra. Felnőtt interszex fenotípusú *C. elegans*. A szex-determinációs útvonal mutációi megváltoztathatják az állat nemét vagy módosíthatják nemi jellegeit. Egyes funkciócsökkenéses (*rf*) mutációk hatására ún. interszex állatok alakulnak ki, melyek változatos, köztes tulajdonságokkal rendelkeznek a hím és hermafrodita fenotípusok közötti skálán. A képen egy *tra-1(e1488) rf* XX (kromoszómálisan hermafrodita) interszex állat látható. Teste nagy része hím fenotípusú (hím jellegű farok, idegrendszer, nincs vulvaszövet), de a bél és az ivarmirigy hermafrodita jellegűek.

3.1.2.1. A TRA-1 szex-determinációs fehérje

A *tra-1* génről két mRNS íródik át, a hosszabb (~5 kb) a *tra-1a*, mely az állat egész élete során jelen van, és a rövidebb (~1,5 kb) a *tra-1b*, melynek expressziója L2 lárvastádiumban éri el a maximumát³⁷. A TRA-1A (1110 aminosav) öt cink-ujj motívummal rendelkezik és szekvencia-specifikus DNS/RNS kötésre képes. A TRA-1B (288 aminosav) a TRA-1A N-terminális régióját és az első két cink-ujj motívumot tartalmazza, és nem képes *in vitro* DNS-kötésre³⁸. Az ivarspecifikus tulajdonságok meghatározásában a TRA-1A-nak (továbbiakban TRA-1) van szerepe, a TRA-1B funkciója ismeretlen. A *tra-1* mRNS azonos mennyiségben íródik át mindkét nemből, a TRA-1 fehérje és főleg annak aktív, C terminálisan hasított foszfoizoformája már jellegzetesen a hermafroditákban található meg, mivel hímekben proteolitikus lebontásra kerül. Kis mennyiségű teljes hosszúságú TRA-1 fehérje a hímekben is jelen van, aminek azonban valószínűleg csak a csírvonalban van szerepe^{32,35,37–39}.

A TRA-1 a *Drosophila* Ci (*cubitus interruptus*) fehérjének és a gerinces GLI (Glioma-associated) fehérjéknek a nematoda ortológja. A Ci és GLI fehérjék a Hedgehog (Hh) jelátviteli útvonal transzkripciós faktorai^{32,40}. *C. elegans*-ban nincs kanonikus Hh jelátviteli útvonal, de az útvonal több tagja (pl. TRA-2A) megtalálható az állatban. Ez arra utalhat, hogy a sex-determinációs útvonal a Hh jelátviteli útvonalból evolválódhatott *C. elegans*-ban³².

3.1.2.1.1. Ismert TRA-1 célgénék

A TRA-1 az ivarspecifikus tulajdonságok fő meghatározója, aktivitása dönti el az állat nemét. Az aktív TRA-1 a hermafrodita fejlődést támogatja, míg a hím fejlődést gátolja. Minden ivarspecifikus különbséget kialakító gén végső soron a TRA-1 közvetlen vagy közvetett szabályozása alatt áll³². Érdekes módon viszonylag kevés közvetlen TRA-1 célgén (*egl-1*, *mab-3*, *fog-3*, *ceh-30*, *dmd-3*, *lin-39*, *xol-1* és *unc-6*) ismert^{26,41–50}.

Az *egl-1* (*egg-laying defective*) és *ceh-30* (*C. elegans homeobox*) a HSN (*hermaphrodite specific motor neuron*) neuronok illetve CEM (*male specific cephalic neuron*) neuronok ivarspecifikus sejtthalálát szabályozza^{41,45}. A *dmd-3* (*DM domain family*) és *mab-3* (*male abnormal*) gének a hím párhószerv^{43,46}, a *lin-39* (*abnormal cell lineage*) pedig a hermafrodita párhószerv (vulva) kialakításában játszik szabályozó szerepet⁴⁷. A *mab-3* ezen kívül részt vesz

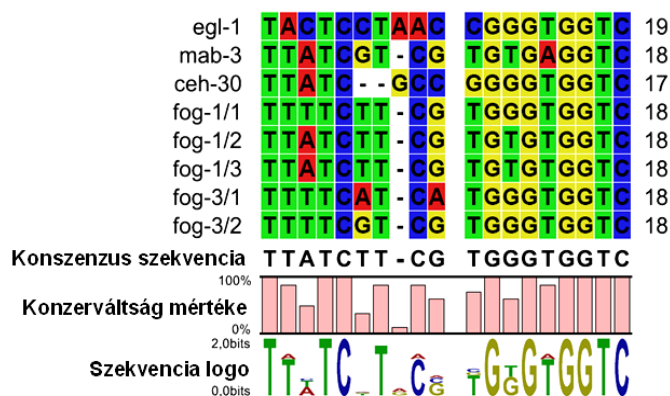
a bél ivarspecifikus meghatározásában. A hermafroditákra jellemző szikanyag termelődését, illetve olyan gének expresszióját kontrollálja, melyek szerepet játszanak az oxidatív stressztűrés ivarspecifikus szabályozásában^{26,43}. A *dmd-3*-nak a PHC neuron ivarspecifikus jellegzetességeinek kialakulásában is szerepe van⁵⁰. Az *unc-6* (*uncoordinated*) szükséges a PHC és AVG neuronok közötti szinaptikus kapcsolat hím-specifikus fenttartásáért a nemi érés során⁴⁹. A *fog-3* (*feminization of germline*) a spermiumok és petesejtek termelését szabályozza⁴⁴. A TRA-1 – *xol-1* szabályozási kapcsolat megerősíti és biztosítja a szex-determináció és a megfelelő dóziskompenzáció fenttartását a hermafroditák összes sejtjében az egyedfejlődés során⁴⁸. Szinte az összes eddig meghatározott célgén esetében a TRA-1 mint represszor működik (gátolja a célgén expresszióját). Ez alól kivételt képez a *fog-3*, melynek szabályozó régiójában több TRA-1 kötőhely is található, és egyes esetekben a TRA-1 mint aktivátor vesz részt a gén szabályozásában⁴⁴.

3.1.2.1.2. TRA-1 kötőhelyek a *C. elegans* genomban

Az eddig feltárt TRA-1 célgének kis számából és korlátozott szerepéből következően még mindig keveset tudunk arról, hogy az egyes ivarspecifikus tulajdonságok pontosan hogyan alakulnak ki. Ahhoz, hogy fel tudjuk deríteni a nemi jellegeket meghatározó molekuláris hátteret, az egyik legfontosabb lépés, hogy meghatározzuk a TRA-1 közvetlen célgénjeit, hiszen ezek a kapcsolatok azok, melyek a globális szex-determinációt összekötik a specifikus nemi jellegekkel. Egy korábbi doktoranduszunk, Hargitai Balázs *in silico* módszerrel meghatározta a feltételezett konszenzus TRA-1 kötőszekvenciát (6. ábra), és az egyes nukleotidok konzerváltságát figyelembe véve keresést végzett a teljes *C. elegans* genomban. 42 olyan gént azonosított, melyek szabályozó régiójában potenciális TRA-1 kötőhely található⁵¹. Megvizsgálta egy evolúciósan közeli rokon faj, a *Caenorhabditis briggsae* ortológ génjeinek genomi környezetét is. 21 gén esetében mindkét fajban hasonló genomi pozícióban találta meg az azonosított TRA-1 kötőhelyet, ami evolúciós konzerváltságra utal. Az így azonosított gének közül kettőről, a *xol-1*-ről és a *lin-39*-ről kutatócsoportunk azóta már igazolta, hogy valóban közvetlen TRA-1 célgének^{47,48}.

Időközben egy másik kutatócsoport is elkezdte a TRA-1 célgének szisztematikus (genom-szintű) felderítését⁴². Kromatin immunoprecipitációt követő szekvenálással 184 potenciális

TRA-1 célként azonosítottak, melyből 19-t *C. briggsae*-ben is megtaláltak ugyanezzel a módszerrel. A potenciális TRA-1 célgének között számos heterokronikus szabályozó gén és a *xol-1* mellett a globális szex-determinációs útvonal több *upstream* tagja is megtalálható⁴².



6. ábra. A TRA-1 konszenzus kötőhely meghatározásakor kapott szekvencia logo. Az elemzéskor már ismert TRA-1 kötőszekvenciák (ábra felső része) alapján történt a TRA-1 konszenzus kötőszekvencia (ábra alsó része) meghatározása. (Hargitai, 2009⁵¹)

3.1.2.1.3. Doktori munkám tárgyát képező TRA-1 célgének

A kutatócsoportunk által meghatározott potenciális TRA-1 célgének közé tartozik a *daf-16* (*abnormal dauer formation*) és a *goa-1* (*G protein, O, Alpha subunit*). A DAF-16/FoXO az inzulin/IGF1 (*insulin-like growth factor*) jelátviteli útvonal transzkripciós faktora, melynek kiemelt szerepe van az egyedfejlődés, az anyagcsere, különböző stresszválaszok és az öregedési folyamat szabályozásában⁵². A GOA-1 az emlős heterotrimer G fehérje α alegységének (Gi/o osztály) *C. elegans* ortológja. A GOA-1-nek számos folyamatban (pl. neuron migráció, sejtosztódás) és viselkedési mintázatban (pl. mozgás, párzás, párkereső viselkedés) kimutatták már a szerepét⁵³. Ezekben a tulajdonságokban (egyedfejlődés, idegrendszer fejlődése, anyagcsere, öregedés és viselkedés) valóban markáns nemi különbségek figyelhetők meg az állatban. Potenciális TRA-1 kötőszekvenciák jelenléte a *daf-16* és *goa-1* lokuszokban felvetette annak lehetőségét, hogy a TRA-1 közvetlenül szabályozza az ezen gének által meghatározott biológiai folyamatokat. Doktori munkám során ezeket a potenciális szabályozási kapcsolatokat (TRA-1 – *daf-16* és TRA-1 – *goa-1*) vizsgáltam meg. Doktori disszertációmban az öregedés és az idegrendszer fejlődésének vizsgálata során kapott eredményeinket fejtem ki részletesebben. A többi eredmény a kapcsolódó cikkekben^{22,54},

illetve két másik doktori disszertációban (Kosztelnik Mónika és Kutnyánszky Vera) kerül bővebb kifejtésre.

3.1.3. Az öregedési folyamat

A biológiai kutatások egyik mai frontvonala az öregedési folyamat szabályozására és mechanizmusára vonatkozik⁵⁵. Számos betegség (pl. rák, neurodegeneratív betegségek, szív- és érrendszeri megbetegedések, izomsorvadás, és immundeficienciák) legnagyobb rizikófaktora az életkor, így ezen betegségek elsődleges megelőzési módja az öregedési folyamat lassítása lehetne⁵⁶.

Az öregedés egy soktényezős, komplex biológiai folyamat. A fejlődés befejeztével, a nemi érés után kezdődően a sejtekben fokozatosan molekuláris károsodások halmozódnak fel. Az életkor előrehaladtával a felhalmozódó károsodások a fiziológiai integritás csökkenéséhez és az életfunkciók leromlásához vezetnek. Az egyed egyre kevésbé tud alkalmazkodni a környezeti körülményekhez, különböző stresszekhez, és végül öregkori betegségek alakulnak ki, ami végül az egyed halálát eredményezi. A sejtes károsodások megjelenése sztochasztikus, így érthető, hogy a faj egyedei miért rendelkeznek különböző élettartammal^{55,57–59}. Jelenleg nincs egységesen elfogadott definíció az öregedésre, elsősorban az élettartam mérésével szoktuk az öregedést jellemezni⁶⁰.

3.1.3.1. Az öregedés általános molekuláris jellegzetességei

Noha számos különbség figyelhető meg az öregedés során a populáció egyedi között, ugyanakkor vannak olyan molekuláris változások, melyek minden egyed öregedési folyamatára egyaránt jellemzők (7. ábra). A genom integritását és stabilitását az egész élet során veszélyezteteti számos külső (fizikai, kémiai, biológiai) és belső (pl. replikációs hibák, reaktív oxigén gyökök) faktor. Ezek érinthetik közvetlenül a sejtmagi vagy a mitokondriális genomot, vagy közvetve hatnak a genom stabilitására. Az élőlények komplex DNS hibajavító mechanizmusokkal rendelkeznek, de ezek pontatlansága vagy fokozatos leromlása miatt egyre több, változatos típusú mutáció halmozódik fel a sejtek genomjában, mely végül genomi instabilitáshoz vezet. Ez pedig csökkenti a sejt funkcióját, majd annak halálát

eredményezheti. A masszív szintű sejtpusztulás az érintett szövet funkcionális leépüléséhez vezethet^{58,59}.

Az öregedés során a sejtek osztódásakor a telomer régió (kromoszóma végek) rövidül a szomatikus sejtekben. Ha valamilyen kóros működés miatt a telomer régió hossza egy bizonyos szint alá csökken, az sejtes *senescencia*-hoz vezethet^{58,61}.

Az életkor előrehaladtával jellegzetes epigenetikai módosulások (DNS metilációs mintázat, hisztonok posztranszlációs módosulása, kromatin szerkezeti átalakulás) is megfigyelhetők^{59,62}. Ezeknek szerepük van az öregedés során megfigyelhető RNS érést és DNS hibajavító rendszereket érintő károsodásokban, a növekvő transzkripció zajban (mely a metabolikus és genetikai útvonalakra is hat), a heterokromatikus régiók csökkenésében, és a genomi instabilitásban⁵⁹. A heterokromatikus régiók csökkenésével egyre több mobilis (transzpozázibilis) genetikai elem (TE) válhat aktívvá, mely az öregedési folyamat exponenciális felgyorsulását okozhatja genomkárosító hatásuk miatt⁶³.

Az öregedés és számos öregedéshez kapcsolt betegség együtt jár a fehérje homeosztázis (proteosztázis) fokozatos károsodásával^{59,64}. A sejtekben többféle mechanizmus biztosítja a proteosztázist. Egyrészt hősokk (dajka-) fehérjék látják el más fehérjék struktúrális védelmét⁶⁵. Másrészt a nem javítható fehérjéket az ubikvitin-proteaszóma rendszer vagy az autofágia távolítja el (lebontásra kerülnek)^{66,67}. Az életkor előrehaladtával ezen fenntartó mechanizmusoknak csökken a kapacitása, így a sejtekben idővel sejtes hibák szaporodhatnak fel^{58,59}.

A tápanyag és energiaszintet érzékelő útvonalaknak és molekuláknak (inzulin/IGF-1, mTOR, AMPK, sirtuinok) szintén jelentős szerepe van az öregedési folyamat szabályozásában. Ezek a genetikai rendszerek egy komplex hálózat elemeit alkotják, és más genetikai útvonalakra és sejtes folyamatokra vannak hatással^{56,59,68}.

Az öregedési folyamat során a mitokondriumok fokozatos szerkezeti sérülése és funkcionális leromlása következik be. Ez csökkent energiatermeléshez és a reaktív oxigén ágensek (ROS) megnövekedett mennyiségéhez vezet. A mitokondriumok funkcionális leromlása, a ROS mennyisége és az öregedés kapcsolata részleteiben még nem tisztázott, számos ellentmondó kísérleti eredmény született a témában. Jelenleg talán az látszik a legvalószínűbbnek, hogy a

funkció enyhébb csökkenése kompenzáló homeosztatikus válaszokat indít be, amik nyújthatják az élettartamot, azonban a nagy mértékű károsodás már inkább gyorsítja az öregedést.^{58,59}

A sejtes szenescencia alapvetően védi a szervezetet a károsodott sejtek toxikus és potenciális onkogenikus hatásától. Fiatal felnőttkorban még megfelelően működnek a károsodott sejtek eltávolítását és pótlását végző mechanizmusok, biztosítva a szöveti homeosztázis fenttartását. Az öregedő szervezetben azonban a fenntartó mechanizmusok (hősokk fehérjék, autofágia/proteaszóma ubikvitin rendszer, DNS hibajavító útvonalak) fokozatos leromlása miatt felszaporodnak a sejtes károsodások, amelyek eredményeként a sejtpusztulás mértéke egy gyulladásos folyamathoz vagy egy öregkori degeneratív betegség kialakulásához vezethet^{58,59}.

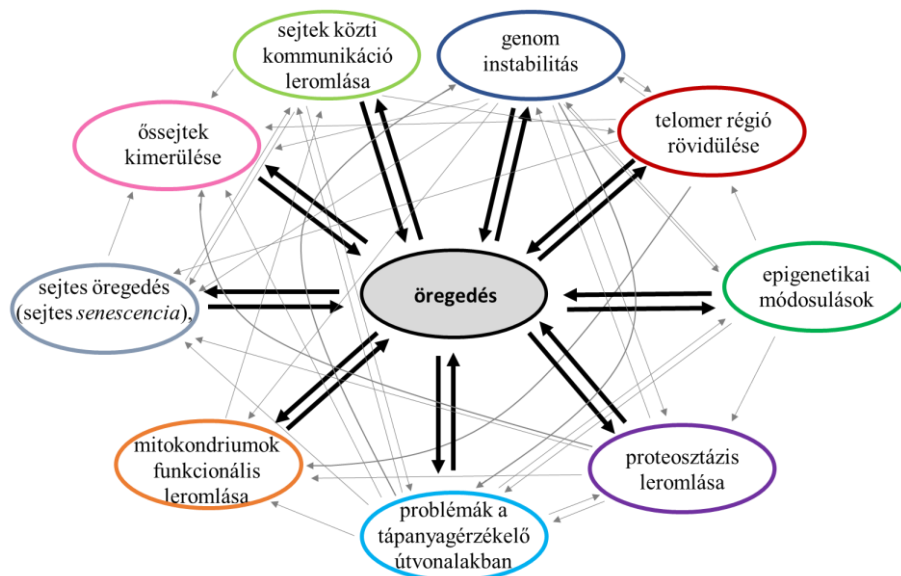
A szövetekben található őssejtek teszik lehetővé a károsodott, elpusztult sejtek pótlását (szöveti regeneráció). Az élettartam során az őssejteket érő károsító hatások különösen jelentősek. Az őssejtek kimerülése szintén az érintett szövet és a szervezet előreagedéséhez vezethet⁵⁹.

A sejtautonóm folyamatok mellett az intercelluláris (endokrin, neuroendokrin, neuronális) kommunikáció is változik az öregedés során. A neuroendokrin rendszer funkciója életkorral romlik, gyulladásos reakciók alakulnak ki, az immunrendszer funkciója ugyanakkor szintén csökken, így a peri- és extracelluláris környezet is megváltozik. Az intercelluláris kommunikáción keresztül az előreagedő sejt indukálja a szomszédos sejtek öregedését, és az öregedő szövet a többi szövetben is öregedési folyamatokat indíthat be, mely végül a teljes szervezet öregedéséhez és halálához vezethet⁵⁹.

3.1.3.2. Az öregedési folyamat szabályozása

Számos evolúciós és molekuláris elmélet született már az öregedés mechanizmusára vonatkozóan, de eddig egyik elmélet se nyújtott kielégítő magyarázatot a folyamat kialakulására vonatkozóan^{55,58}. Genetikai kísérletek szerint számos genetikai útvonal és szabályozó fehérje vesz részt az öregedési folyamat kontrollálásában. Az előző fejezetben említett molekuláris faktoroknak szerepük van ebben a szabályozásban; az őket érintő

mutációk hatással vannak az élettartamra (a megnövekedett élettartam alapján sikerült ezen funkciójukat azonosítani)⁵⁹. Ugyanakkor úgy tűnik, hogy egyik sem felel önmagában az öregedés kialakulásáért, sokkal inkább egy bonyolult szabályozási hálózatot alkotnak (7. ábra).

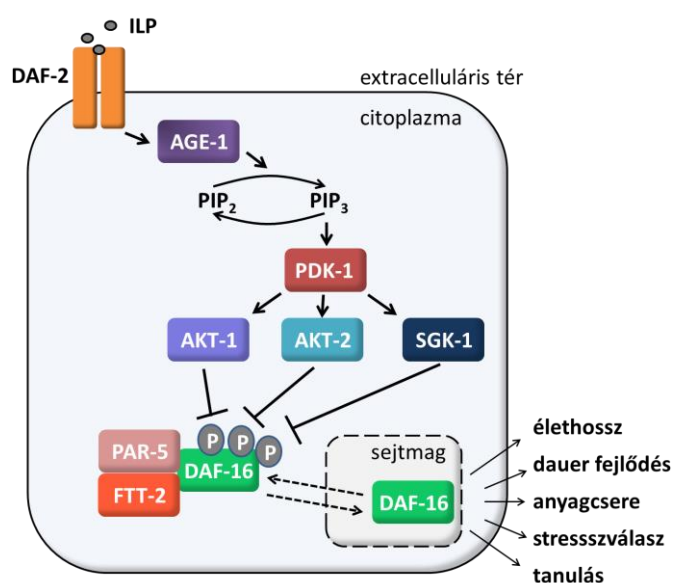


7. ábra. Az öregedés molekuláris jellegzetességei és azok kapcsolatai Kilenc olyan molekuláris/sejtes faktort határoztak meg, amelyek jellemzik és egyben hozzá is járulnak az öregedés folyamathoz. Az egyes faktorok között bonyolult kapcsolati hálózat rajzolható fel. Például a genomi instabilitás a proteosztázis leromlását eredményezheti, ami viszont csökkent mitokondriális funkcióhoz vezethet. A nyílak a faktorok között ható kapcsolatok irányát jelölik. Az ábrán csak azok a lehetséges hatások vannak jelölve, melyek említésre kerülnek a López-Otín és mtsai. (2013) cikkében. (López-Otín és mtsai, 2013⁵⁹, módosítva)

Az élettartamot befolyásoló genetikai útvonalak biztosítják részben, hogy a szervezet életben maradjon kedvezőtlen környezeti feltételek között is (stressz-válasz). Ha a környezeti tényezők kedvezők, akkor ezek a mechanizmusok a növekedést és reprodukciót támogatják. Kedvezőtlen környezeti körülmények között azonban globális fiziológiás változást alakítanak ki, amely alapvetően a sejtek védelmére és fenntartására irányul. Ezeknek a szabályozó útvonalaknak megvan az a potenciális képességük, hogy befolyásolják az élettartamot, ellensúlyozva az öregedést serkentő metabolikus károsodások hatásait. Ebbe a modellbe illeszkedik az a megfigyelés is, miszerint sok hosszú élettartamú mutáns igen ellenálló a táplálkozási, oxidatív és hőstresszel szemben^{56,57}. Ezek a környezeti tényezők az élettartam legfőbb külső szabályozói. A különböző környezeti hatások és fiziológiás jelek okozta élettartam növekedést táplálkozási és stressz-szenzorok közvetítik⁵⁶.

3.1.3.2.1. Az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonala

Az inzulin/IGF-1 jelátvitel volt az első genetikai útvonala, melyről kimutatták, hogy befolyásolja az élettartamot⁶⁹. Az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonala szerkezete és funkciója evolúciósan konzervált az élesztőtől emlősökig (8. ábra). Az útvonala részt vesz az anyagcsere és a stressz-hatásokkal szembeni ellenállóképesség szabályozásában, valamint hat a fertilitásra és az élettartamra^{55,56}. *C. elegans*-ban az útvonala *downstream* transzkripciósi faktora a DAF-16/FoXO transzkripciósi faktor.



8. ábra. Az inzulin/IGF jelátviteli útvonala *C. elegans*-ban. Ligandum- (ILP) kötött állapotban a DAF-2/IGFR transzmembrán receptor egy foszforilációs kaszkádot indít be a citoplazmában (melyet különböző kinázok közvetítenek), melynek eredményeként az útvonala *downstream* transzkripciósi faktora, a DAF-16/FoXO foszforilálódik, komplexet alkot a FTT-2 és PAR-5 fehérjékkel, és a citoplazmában lokalizálódik. Ligandum-kötés hiányában nem indul be ez a foszforilációs kaszkád a sejtben, így a DAF-16 a sejtmagba transzportálódik, és transzkripciósi faktorként aktiválja/represszálja a célgének működését. A DAF-16 magi lokalizációja a körülményektől és a fejlődési stádiumtól függően növeli az élettartamot, serkenti a dauer lárvafejlődést és stressz-válaszokat, valamint hatással van az anyagcserére és a tanulási képességre. ILP: insulin-like peptid, PIP₂: foszfatidil-inozitol 4,5-biszfoszfát, PIP₃: foszfatidil-inozitol-3,4,5-triszfoszfát, AGE-1/PI3K: AGEing alteration/phosphoinositide 3-kinase, AKT: AKT kinase family, SGK-1: serum and glucocorticoid inducible kinase homolog, FTT-2: Fourteen-Three-Three family, PAR-5: abnormal embryonic partitioning of cytoplasm).

A *C. elegans* genom 40 inzulin-szerű molekulát (ILP: *insulin-like peptid*) kódol⁵². A különböző környezeti hatások különböző alcsoportok expresszióját váltják ki; eltérés lehet az expresszió helyében és az ILP-k funkciójában. *C. elegans*-ban egyetlen inzulin/IGF-1

transzmembrán receptor található, a *DAF-2/IGFR* (*abnormal DAuer Formation/IGF* receptor), melynek ligandum kötése egy foszforilációs kaszkádot indít be a sejtben. Ligandum-kötött állapotban a receptor dimerizálódik, és foszforilálja az AGE-1/PI3K (*AGEing alteration/phosphoinositide 3-kinase*) kinázt. Az aktív AGE-1/PI3K PIP₃-má (foszfatidil-inozitol-3,4,5-triszfoszfát) foszforilálja a PIP₂ (foszfatidil-inozitol 4,5-biszfoszfát) szubsztátot. A megnövekedett PIP₃ koncentráció hatására PIP₃-függő protein kináz ortológ, a PDK-1 (*PDK-class protein kinase*) aktiválódik és foszforilációval aktiválja az AKT-1 (*AKT kinase family*), AKT-2 és SGK-1 (*serum and glucocorticoid inducible kinase homolog*) fehérjéket. Ezek a kinázok foszforilálják a DAF-16/FoXO fehérjét, mely ekkor komplexet alkot 14-3-3 fehérjékkel [FTT-2 (*Fourteen-Three-Three family*) és PAR-5 (*abnormal embryonic partitioning of cytoplasm*)]. Foszforilált állapotban a DAF-16/FoXO nem képes a sejtmagba jutni, így a citoplazmában lokalizálódik. Ligandum-kötés hiányában nem indul be a foszforilációs kaszkád, a DAF-16 így transzportálódhat a sejtmagba, ahol transzkripciós faktorként működik^{52,55}.

3.1.3.2.1.1. DAF-16/FoXO által szabályozott gének, folyamatok

A DAF-16/FoXO-nak számos közvetlen és közvetett célgénjét írták le, melyek a legkülönbözőbb folyamatokban vesznek részt: különböző stressz-válaszokban (oxidatív, nehézfém, hő-, proteotoxikus és hipertóniás stressz), patogén rezisztenciás és detoxifikációs folyamatokban, anyagcserében (szénhidrát, zsír, fehérje és koleszterin/szteroid), fejlődési folyamatokban, intra- és extracelluláris jelátvitelben, sejthalálban (apoptózis), transzkripciós és transzlációs folyamatokban, a proteosztázis fenttartásában neuronális jelátvitelben^{52,70–77}. A DAF-16/FoXO által szabályozott folyamatok valószínűleg kooperatív és kummulatív módon hatnak az élettartamra⁵².

Az *in vitro* meghatározott DBE szekvenciát (*DAF-16 binding element- DAF-16 kötő elem*) számos gén szabályozó régiójában találták meg, attól függetlenül, hogy a DAF-16/FoXO serkenti vagy gátolja kifejeződésüket^{52,73}. Máig nem tisztázott, hogy pontosan hány közvetlen célgénje lehet a DAF-16/FoXO fehérjének, és hogy ezek a célgének hogyan vesznek részt a különböző folyamatok szabályozásában. Egyes vizsgálatok specifikus effektor funkciókat ellátó közvetlen célgéneket azonosítottak, míg más vizsgálatok inkább szabályozó funkcióval rendelkező célgéneket azonosítottak^{52,70,71,73,75,77,78}.

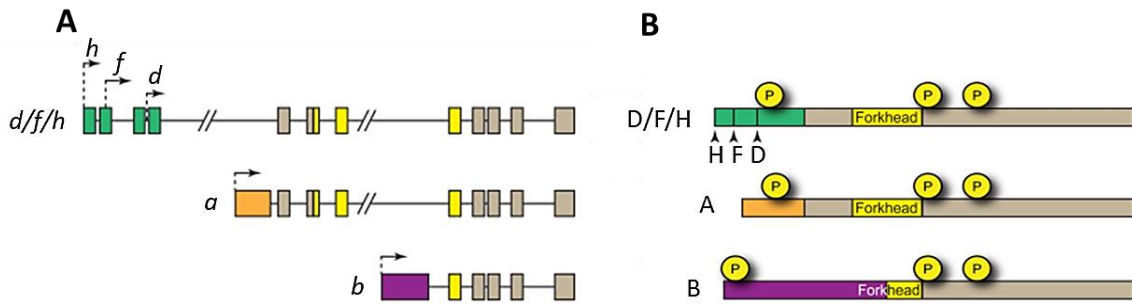
3.1.3.2.1.2. A DAF-16/FoXO fehérje inzulin/IGF útvonaltól független szabályozása

Bár a DAF-16/FoXO fő szabályozója az inzulin/IGF-1 jelátviteli rendszer, ezen kívül számos genetikai útvonal és fehérje szabályozhatja direkt vagy indirekt módon a fehérje aktivitását [pl. AMPK (5' AMP-activated protein kinase), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) és TOR (*target of rapamycin*) jelátvitel, valamint a sirtuinok⁵²]. A DAF-16/FoXO aktivitását különböző környezeti stresszhatások (pl. magas hőmérséklet, nehézfém és oxidatív stressz, tápanyag hiány), a sejt energiaszintje és a csíravonal aktivitása is befolyásolják. A legtöbb DAF-16 szabályozó fehérje poszttranszlációs módosításokon (pl. foszforiláció, acetiláció, metiláció és ubikvitinizáció) keresztül hat a DAF-16/FoXO aktivitására. Ezek a módosítások a fehérje szubcelluláris lokalizációját, stabilitását vagy DNS-kötő képességét befolyásolhatják. A DAF-16/FoXO transzkripcionálisan szintén szabályozódik^{52,78,79}.

Az inzulin/IGF-1 útvonal a DAF-16/FoXO-n túl más transzkripciós faktorokat is képes befolyásolni. Ilyen inzulin/IGF-1 célpontok a HSF-1 (*heat shock factor*), SKN-1 (*skinhead-1*) és PQM-1 (*paraquat (methylviologen) responsive*) fehérjék. Számos folyamatot (pl. különböző stressz válaszokat) a DAF-16, a HSF-1 és a SKN-1 közösen szabályoz. Egyes eredmények szerint pedig a DAF-16 és PQM-1 ellentétesen szabályozzák ugyanazon célgéneket⁵².

3.1.3.2.1.3. *daf-16* izoformák *C. elegans*-ban

Bár egyetlen *daf-16/FoXO* gén található a *C. elegans* genomban, de a különböző izoformák lehetővé teszik a célgének szövet- és folyamatspecifikusan szabályozását. A Wormbase jelenlegi verziója (WS265) 12 különböző *daf-16* izoformát prediktál: *R13H8.1a-m*. Ezek közül 3 izoforma csoport tűnik funkcionálisnak: *daf-16a1/a2* (*R13H8.1b/c*), *daf-16b* (*R13H8.1a*) és *daf-16d/f/h* (*R13H8.1d/f/h*) (9. ábra)^{52,79}. A funkcionális izoformák nagyrészt különböző promóterekről íródnak át, és az általuk kódolt fehérjéknek különböző N terminális végük van. Mindegyik ilyen izoformának van két közös AKT-függő foszforilációs helye a Forkhead DNS-kötő doméntól C-terminális irányban, de van egy egyedi is az N terminális végen⁵².



9. ábra. Funkcionális *daf-16* izoformák. *C. elegans*-ban 12 prediktált *daf-16* izoforma van, de ebből csak 3 csoport tűnik funkcionálisnak: *d/f/h*; *a* és *b*. (A) A 3 funkcionális *daf-16* izoforma csoport sematikus genomi szerkezete. Az izoformáknak nagyrészt különbözik a promóterük A *d* és *f* izoformák transzkripció kezdőpontja azonos. Négyszögek: exoni régiók, vonalak: introni régiók, nyíl: transzlációs start hely. Az izoforma-specifikus exonok színesek (zöld, narancs, lila), a sárga színű exonok kódolják a Forkhead domént. A promóterek 3' és 5' UTR régiók nincsenek feltüntetve az ábrán. (B) A három funkcionális izoforma csoport fehérjéinek sematikus szerkezete (H:541, F:517, D:487, A:508, B:530 aminosav). Az izoforma specifikus exonokról transzlálódó részek színesek (zöld, narancs és lila). A DNS-kötő doméntől (Forkhead) C-terminális irányba van két közös AKT-függő foszforilációs hely az izoformákon, de mindhárom izoforma csoportnak van egy egyedi doménje az N terminális végén. (Murphy és mtsai, 2013⁵²)

A *daf-16d/f/h* izoformák ugyanarról a promóterről íródnak át, de különbözik az 5' végük és a transzlációs kezdőpontjuk. A *d* és *f* izoformának azonos a transzkripció kezdőpontja^{79,80}. A 3 izoforma különálló szerepét egyelőre nem elemezték. Munkám során a *d/f/h* izoformákat vizsgáltam, de mivel a megjelent cikkekben *d/f* izoformaként hivatkoznak rájuk (a *h* izoformát később írták le), így a dolgozatban is ezt a megnevezést követem.

A *daf-16* izoformák szövetspecifikus expressziót mutatnak. Szabályozásuk és funkciójuk részben különbözik. Úgy tűnik, hogy elsősorban a promóter régió felelős a *daf-16* izoformák szövetspecifikus expressziójáért⁸¹. Az *a* izoforma többféle szövetben fejeződik ki, de főleg az izmokban és neuronokban. A *d/f* expressziója ugyancsak széleskörű, legjelentősebb a garatban, hipodermiszben, neuronokban és a bélben. A *b* izoforma a garatban, idegsejtekben és a szomatikus gonádban expresszálódik^{52,81}.

Az élettartam szabályozásában bizonyos neuronoknak és elsősorban a bélrendszernek tulajdonítanak kitüntetett szerepet^{55,82}. Ezzel összhangban az eddigi kutatási eredmények alapján az élettartam szabályozásában elsősorban a *daf-16d/f* és *a* izoformák vesznek

részt^{80,81}. Még tisztázatlan, hogy melyik izoformának mekkora a jelentősége az öregedés szabályozásában. Kwon és munkatársai⁸¹ a *d/f* izoforma, míg Chen⁸⁰ és munkatársai az *a* izoforma elsődleges szerepét mutatták ki. Az eltérés oka lehet, hogy Chen és munkatársai szerint az *a* izoforma egyik transzkriptuma a saját promóter szabályozása alatt áll, míg a másik transzkriptuma a *d/f* izoforma promóteréről íródhat át^{52,80,81}. Az *a* és *d/f* izoformáknak nagyobb a szerepe az anyagcsere és a stresszválaszok szabályozásában is. A dauer fejlődés szabályozásában mindhárom izoforma részt vesz^{52,80,81}.

Az *upstream* szabályozó kinázok is eltérő arányban befolyásolják a különböző *daf-16* izoformák aktivitását. Ezen kinázok szövet-specifitása különbözhet. A *daf-16* izoformák szubcelluláris lokalizációja is bizonyos mértékben eltér egymástól. Az *a* izoforma inkább magi lokalizációt mutat, míg a *d/f* izoforma egyenlően oszlik meg a citoplazma és a sejtmag között. A szubcelluláris lokalizációt elsősorban a fehérjék N terminális vége befolyásolja^{52,81}. A DAF-16 célgénnek egy részét az izoformák egymástól függetlenül (specifikusan) szabályozzák, míg más esetekben az izoformák átfedően vagy kooperatívan működnek együtt⁸¹.

3.1.3.3. Ivarspecifikus öregedés az állatvilágban

A legtöbb szexuálisan dimorf állatfajnál nemi különbség figyelhető meg az élettartamban. Sok esetben a nőstények élnek tovább, ez alól kivételt számos madár és néhány rovarfaj képez⁸³. Emberben a nők jelentősen (5-7 évvel) tovább élnek a férfiaknál. Demográfia adatok szerint ez a tendencia évszázadokra nyúlik vissza⁸⁴. Az öregedéshez kapcsolt betegségek is jellegzetes nemi különbséget mutatnak. A férfiak pl. jobban érintettek a szív- és érrendszeri betegségekben, a legtöbb ráktípusban, a Parkinson-kórban és az agyvérzésben. A nőknél az Alzheimer-kór, az autoimmun betegségek és csontritkulás fordul elő jóval gyakrabban^{60,84}. Az élettartamot befolyásoló faktorok (genetikai, étrendi és kémiai) is eltérő hatásúak lehetnek a nemekben⁶⁰. Az élettartamban megfigyelhető nemi különbségek okainak kutatásában két fő irányvonal létezik. Az egyik az evolúciós faktorokat (pl. különböző szaporodási rendszerek, eltérő szelekciós nyomás és különböző szülői befektetés) elemzi, a másik megközelítés a molekuláris hátteret próbálja feltárni⁸⁴.

3.1.3.3.1. Az ivarspecifikus élettartam molekuláris modelljei

Mi lehet a molekuláris alapja az állatvilágban megfigyelhető ivarspecifikus élettartam különbségeknek? Jelenleg a legszélesebb körben elterjedt elméletek az eltérő ivari kromoszómaszámot, a mitokondriumok anyai öröklődését, ill. az nemi hormonokat jelölik meg, mint a különbséget kialakító legfontosabb faktorokat^{60,83,84}.

Az állatvilágban számos faj egyedeinek nemét az ivari kromoszómák határozzák meg. Az egyik nem két azonos ivari kromoszómával (homogamétás nem, XX, ZZ), míg a másik nem egy darab vagy két különböző ivari kromoszómával (heterogamétás nem, XY, ZW, XO) rendelkezik. A heterogamétás ivar esetében számos génből csak egy kópiával, míg a homogamétás ivar esetében két kópiával rendelkezik az egyed. A dóziskompenzáció biztosítja, hogy a két nemből mégis közelítőleg azonos legyen az ivari kromoszómán lokalizált gének expressziós szintje. Két elmélet is foglalkozik a kromoszómális nem élettartamra gyakorolt hatásával^{60,83,84}. Az ún. „védtelen X kromoszóma” elmélet szerint a hímek rövidebb élettartama az emlősök között abból fakad, hogy ők reprezentálják a heterogamétás (XY) nemet. Ha probléma van az X kromoszómán található gének egyik kópiájával, a homogamétás nemnél nagy valószínűséggel a másik kópia pótolni tudja a kieső génfunkciót, míg a heterogamétás nemből erre nincs lehetőség. Számos madár, pillangó és moly fajnál, ahol a nőtények a heterogamétásak (ZW), az élettartam rövidebb, mint a homogamétás hímeknél. Azonban számos ellenpélda található különböző rendszertani kategóriákban^{60,83,84}.

Az ún. „menekülő X kromoszóma” elmélet a dóziskompenzáció hiányos működéséből fakadó jelenségre utal, melynek hatása lehet öregedésre. Megdőlt ugyanis az a felfogás, miszerint a nőtény emlősök minden sejtjében az egyik X kromoszóma teljes mértékben inaktiválódik. Az X kromoszóma számos régiójáról kimutatták, hogy „megszökik” a transzkripciója (tehát alacsony szinten működik az allél), és így bizonyos gének a nőtényekben a két darab X kromoszómáról nagyobb dózisban íródnak át, mint hímekben. Ez a jelenség az életkor előrehaladtával még jelentősebb lehet. Ennek káros és előnyös hatásai is lehetnek az öregedés folyamatára. Egyes immunszabályozó génekről kimutatták például, hogy nem teljesen inaktiválódnak a dóziskompenzáció során. Ez szerepet játszhat abban, hogy a nőknek jobban működik az immunrendszere, de ebből fakadhat az is, hogy a nők körében sokkal gyakoribbak az autoimmun betegségek^{60,85}.

Az ún. „anyai átok” elmélet a mitokondriumok aszimmetrikus öröklődését tartja a nemek közötti élettartam különbségek okának. A mitokondriumokat csak az egyik szülő örökíti tovább, heterogamétás fajoknál jellemzően az anya. Ez olyan szelekciós tényező, melynek következtében a mitokondriális genom, illetve a mitokondriális genom és a sejtmagi genom kapcsolata a nőtények igényeihez optimalizálódik^{60,83,84}.

Emlősöknél a nemi hormonok (androgének és ösztrogének) a legfontosabb szabályozói a nemi különbségeknek. Hatásuk lehet az élettartamra is. Úgy tűnik, hogy az ösztrogén inkább pozitívan befolyásolja, míg a tesztoszteron csökkenti az élettartamot. Ezek a hormonok szexuálisan dimorf viselkedést (pl. a hímek agresszívebbek, kockázat vállalóbbak), immunitást (nőkben aktívabb az immunrendszer, gyakoribbak az autoimmun betegségek) és ROS koncentrációt (nőkben magasabb) alakítanak ki, és számos genetikai és metabolikus útvonalra vannak hatással⁸³.

3.1.3.3.2. Ivarspecifikus élettartam *C. elegans*-ban

A *C. elegans* azok közé a modellszervezetek közé tartozik, melyekben elsők közt kezdték el vizsgálni az élettartamban mutatkozó nemi különbségeket. Bár az egyértelmű, hogy a két nem élettartama különbözik, érdekes módon azonban még ma sem tisztázott, hogy melyiké a hosszabb. Vegyes vagy egynemű csoportokat vizsgálva egyértelműen a hermafroditák élnek tovább²⁰, míg magányos tartás esetén a hímeknél figyelhető meg jelentősen hosszabb élettartam¹⁹. Májig eldöntetlen, hogy mely vizsgálati beállítás tükrözi jobban a genetikailag meghatározott élettartamot. Fenntartási körülmények, genetikai faktorok, ivarspecifikus viselkedési mintázat, nemek közti, illetve azonos nemű egyedek közötti interakciók eltérően hathatnak a nemek élettartamára^{19–21,23,24,86–88}.

Az életkor előrehaladtával a dóziskompenzáció csökken az XX genotípusú hermafroditákban, mely csökkentheti élettartamukat²¹. Míg a hermafroditák nem gyakorolnak jelentősebb hatást egymásra, addig a hím-hím interakció csökkenti a hímek élettartamát. Emellett a hímek egyéb viselkedési mintázata is negatívan hat élettartamukra¹⁹. Ugyanakkor a hímekre jellemző párzópartner kereső viselkedés miatt a hímek gyakran elhagyják a táplálékforrást, ami kalóriacsökkenéshez vagy időszakos éhezéshez vezethet. Ezek a hatások élettartam növekedést okozhatnak más élőlényekben is⁸⁹. A hímek által kibocsátott feromonok főleg a

hímekben, de a hermafroditákban is toxikus hatást váltanak ki, és csökkentik az élettartamot.^{23,24} A fiatal hermafroditák feromonja csak gyenge vonzó hatást vált ki hímekben, de ez a hatás megnő, mikor a hermafroditák saját spermiumai elfogynak idősebb korban. Míg a hermafroditák önmegtermékenyítéssel történő szaporodása úgy tűnik nincs jelentős hatással az élettartamra, addig a párzás a hermafroditákban és a hímekben is élettartam csökkenéshez vezet. A párzás a csíravonal megnövekedett proliferációját váltja ki, melynek hatására a szaporodási időszak után a glikogén raktárak gyorsabban leépülnek, a szikanyag megnövekedett (hímekben ektopikus) expressziója alakul ki a bélben, és az állatok összezsugorodnak^{23,24}. Bár *C. elegans*-ban nincsenek nemi hormonok, úgy tűnik szteroid hormon útvonalnak ivarspecifikus hatása lehet az állat élettartamára²⁵.

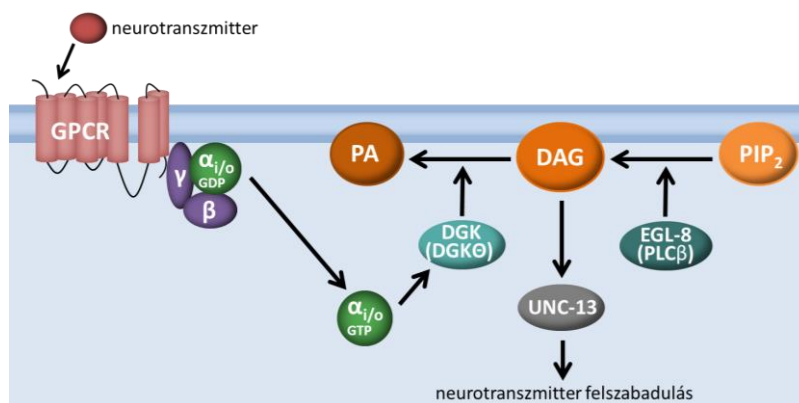
3.1.4. Heterotrimer G fehérjék

A heterotrimer G fehérjék (*guanosine triphosphate binding protein*) három alegységből (α , β és γ) álló sejten belüli jelátvivők (10. ábra)^{53,90}. A β és γ alegység egy stabil komplexet alkot, melyhez az α alegység GDP-kötött inaktív állapotában kapcsolódik. A három alegység ebben a formában kapcsolódik a GPCR (*G protein coupled receptors*) transzmembrán receptor intracelluláris doménjéhez. A klasszikus receptor-függő G fehérje ciklusban a receptor ligandum kötése aktiválja a jelátvitelt. A ligandum kötött, aktív receptor guanin nukleotid kicserélő faktorként (*GEF - Guanine-nucleotide Exchange Factor*) működve az α alegység GDP-jét GTP-re cseréli. Az aktív $G\alpha$ -GTP alegység disszociál a $G\beta\gamma$ alegységtől, és mindkét részegység egymástól függetlenül különböző effektor fehérjékre hathat. Az α alegység GTP-áz aktivitással is rendelkezik, így rövid idő alatt újra GDP-kötött állapotba kerül és asszociál a $\beta\gamma$ alegységekkel és a receptorral. Egyes útvonalakban jelen lehetnek más GEF fehérjék, melyek újra aktiválják az α alegységet, illetve RGS (*regulator of G protein signalling*) fehérjék, melyek a GTP hidrolízis arányát növelve gyorsítják a G fehérje inaktiválódását. Receptor független útvonal is létezik, melyben a GPR (*G protein regulator*) fehérjék megkötik a $G\alpha$ -GDP-t, versenyezve a $G\beta\gamma$ alegységgel. A jelátvitel akkor aktiválódik, mikor a $G\alpha$ alegység disszociál a GPR fehérjétől^{53,90}. *C. elegans*-ban megközelítőleg 180-féle GPCR, 21 $G\alpha$, 2 $G\beta$ és 2 $G\gamma$ fehérje ismert. A szekvenciális hasonlóság alapján meghatározott emlős $G\alpha$ alegység kategóriák (Gs, Gi/o, Gq és G12) közül mind a négynek egy-egy ortológja van *C. elegans*-ban. A többi *C. elegans* $G\alpha$ alegység nem besorolható⁵³.

3.1.4.1. A GOA-1 fehérje funkciója

A GOA-1 a Gi/o osztály egyetlen biztos *C. elegans* ortológja, bár két másik fehérje (GPA-16 és GPA-7) is mutat távolabbi hasonlóságot a Gi/o osztállyal, és úgy tűnik, hogy részben átfed a funkciójuk egyes folyamatokban a GOA-1-gyel^{53,90,91}. Emlősökben és ízeltlábúakban a G α o állandó jelleggel fejeződik ki az idegrendszerben. Ez arra utal, hogy az idegrendszer fejlődésében és funkcionalitásában is fontos szerepe van⁹².

A GOA-1 fehérjének számos alapvető és fontos folyamatban (sejtosztódás, neuron migráció, szinaptikus ingerületátvitel, peterakás, vulva fejlődés, embrionális életképesség, mozgás, hím párzási viselkedés és fertilitás) van szerepe. A legtöbb neuronban, számos izomsejtben, valamint néhány egyéb sejttypusban expresszálódik lárválisan, illetve a felnőtt stádiumban. Embrionálisan minden sejtben kifejeződik. Az eddigi vizsgálatok alapján a GOA-1 az idegsejtekben alapvetően gátolja a neurotranszmitter felszabadulást^{53,90}. A neurotranszmitter felszabadulást valószínűleg a folyamathoz szükséges UNC-13 fehérje preszinaptikus membránhoz való lokalizációjának gátlásán át akadályozza, mégpedig a diacilglicerol (DAG) szint szabályozása által (10. ábra). A neuronok migrációja és a szinaptikus jelátvitel esetében a GOA-1 fehérje receptor-függő módon aktiválódik, és a folyamatot negatívan szabályozza az EGL-10/RGS fehérje (*egg-laying defective/ regulator of G protein signalling*)⁵³.



10. ábra. A GOA-1 fehérje gátolja a neurotranszmitter felszabadulást. A neuronok migrációja és a szinaptikus jelátvitel esetében a GOA-1 fehérje receptor-függő módon aktiválódik, és a DAG szint szabályozása által gátolja a neurotranszmitter felszabaduláshoz szükséges UNC-13 fehérje preszinaptikus membránhoz való lokalizációját. A nyilak aktiválást jelölnek. GPCR: G fehérje kapcsolt receptor; PIP₂: foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát; EGL-8/PLC β : foszfolipáz C β ; DAG: diacilglicerol; DGK: diacilglicerol kináz; PA: foszfatisav.

A GOA-1-nek továbbá szerepe van a korai embrionális sejtosztódások szabályozásában. Ebben a folyamatban a GOA-1 receptor-független módon szabályozódik. A GPR-1 (*G protein regulator*) és GPR-2, valamint a GEF faktorként működő RIC-8 (*resistance to inhibitors of cholinesterase*) aktiválja, míg az RGS-7 (*regulator of G protein signalling*) gátolja a GOA-1 aktivitását. Ebben a folyamatban a GOA-1 funkciója részlegesen redundáns a GPA-16 fehérjével^{53,90}.

A GOA-1-nek szerepe van különböző érzékelési folyamatokban, illetve az azokra adott válaszreakciókban^{53,93-95}, valamint az alvás szabályozásában is⁹⁴. A *goa-1(lf)* mutánsok hiperaktív mozgásúak, korai osztódási fázisban lévő embriókat raknak le, a hímek párzási viselkedése erősen sérült. A *goa-1(gf)* mutánsok mozgása letargikus, későbbi fejlődési stádiumban lévő petéket raknak le, a peték sokszor felhalmozódnak bennük, a párzás hatékonysága alacsonyabb a hímeknél. Kimutatták, hogy az aktivált GOA-1 indukált expressziója felnőtt korban pár órán belül kialakítja ezeket a fenotípusokat⁹².

3.1.5. Ivarspecifikus viselkedés *C. elegans*-ban

A *C. elegans* kedvelt modellállat a viselkedési mintázatok és tanulási folyamatok vizsgálatához. Számos viselkedési mintázata ivarspecifikus sajátosságot mutat. A párzással kapcsolatban elsősorban hímspecifikus viselkedési mintázatokat írtak le. A táplálék elhagyó - párzótárs kereső viselkedés az érett hímekben jelenlévő szexuális hajtóerőből fakad. A lárvákra és hermafroditákra nem jellemző, hogy elhagyják a táplálékforrást, ha mégis, gyorsan visszatérnek a baktérium pázsitra. Ezzel szemben a felnőtt hímek gyakran és hosszan (akár visszatérés nélkül) elvándorolnak, ha nincs a közelben párzótárs. Hermafroditák jelenlétében ez a viselkedési mintázat nem figyelhető meg^{29,31,96}. A hermafroditák által kibocsátott távolabb ható kémiai jelekre (feromonok) adott kemotaxis is hímspecifikus. A párzás is egy többlépéses, hímspecifikus viselkedés. A hímek a közvetlen mechanikus és kémiai jelekből ismerik fel a párzásra alkalmas társat. A farki végükön található mechanikus és kémiai érzékelősejteket tartalmazó ún. legyező képlettel szorosan körbe fogva elkezdí hátrafelé csúszva letapogatni a hermafrodita testét a vulva után kutatva. Ha az adott oldalon nem találta meg, a hermafroditával szoros kontaktust tartva átfordul a másik oldalra és folytatja a keresést. A vulva megtalálása után a spikulumaival (párzótüske) nyitva tartja azt, így biztosít szabad utat a spermiumok átjutásának az ejakulációkor. A folyamat minden egyes

lépése komplex szabályozás alatt áll³¹. *goa-1(lf)* mutáns hímek reagálnak a hermafroditával való érintkezésre és elkezdik a vulva keresését, de a fordulás folyamata és a spikulum behelyezése már nem minden esetben megy végbe. *goa-1(gf)* mutáns hímek lassú mozgása problémát okoz párzáskor⁹².

A hím párzási kísérlete során a hermafroditák folytatják a hímtől független mozgást, mely nehezíti a párzást. Azonban a rendelkezésre álló spermiumok számától függően különbözőképp reagálnak. Az önmegtermékenyítésre képtelen hermafroditák (például kimerült spermiumraktárral rendelkező idősebb állatok) sokkal lassabban mozognak tovább, mint az önmegtermékenyítésre képes társaik³¹.

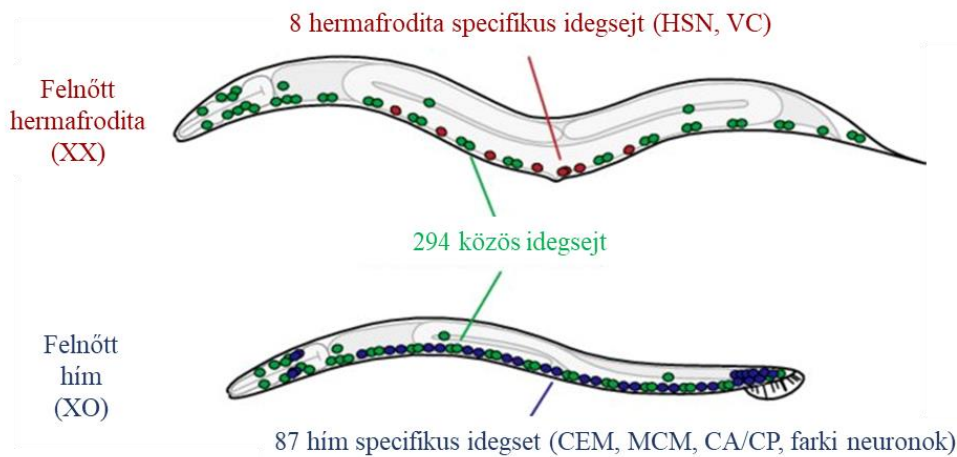
A peterakás hermafrodita-specifikus folyamat. Környezeti faktorok gyorsíthatják, lassíthatják, vagy leállíthatják ezt a folyamatot^{31,97}. A GOA-1-nek a peterakást szabályozó HSN-okban (*hermaphrodite specific motor neuron*) és a vulva izmokban van szerepe⁵³.

Számos, a párzáshoz közvetlenül nem köthető viselkedési formában is nemi különbségek figyelhetők meg. Például eltér a két nem mozgásának dinamikája és geometriája³⁰, az érzékelésük^{17,29,31}, valamint a tanulási képességük^{27,28}.

3.1.6. A *C. elegans* idegrendszer ivarspecifikus jellegzetességei

A *C. elegans* viszonylag kis számú neuronja remek modellként szolgál az idegrendszer fejlődésének, kapcsolatainak és működésének genetikai vizsgálatára²⁹. A hermafrodita idegrendszer 302, a hímeké 385 idegsejtet tartalmaz (11. ábra). Az idegrendszer alapvető felépítése hasonló. Mindkét nemben megtalálható a garatideggyűrű, valamint a feji és farki régiók idegsejtjeit összekötő hasi és háti dúcláncok. A hímekben azonban jelentősen több idegsejt található a farki régióban. A hermafroditák idegrendszerében 8 hermafrodita specifikus idegsejt található: 2 HSN (*hermaphrodite specific motor neuron*) és 6 VC (*hermaphrodite specific ventral cord motor neuron*) neuron. Ezek a vulva körül találhatóak, és a peterakást szabályozzák. A hímek idegrendszere 91 hímspecifikus idegsejtet tartalmaz: 4 CEM (*male specific cephalic neuron*) és 2 MCM (*mystery cells of the male*) a fejben, a maradék 85 legnagyobb része a farki régióban található. A CEM neuronoknak a táplálékelhagyó-párkereső viselkedésében, az MCM-eknek szexspecifikus asszociatív

tanulásban, a többi hímspecifikus neuronnak pedig elsősorban a párzási folyamat szabályozásában van jelentős szerepe. A maradék 294 idegsejt mindkét nemből egyaránt megtalálható^{16,17,28,98}.



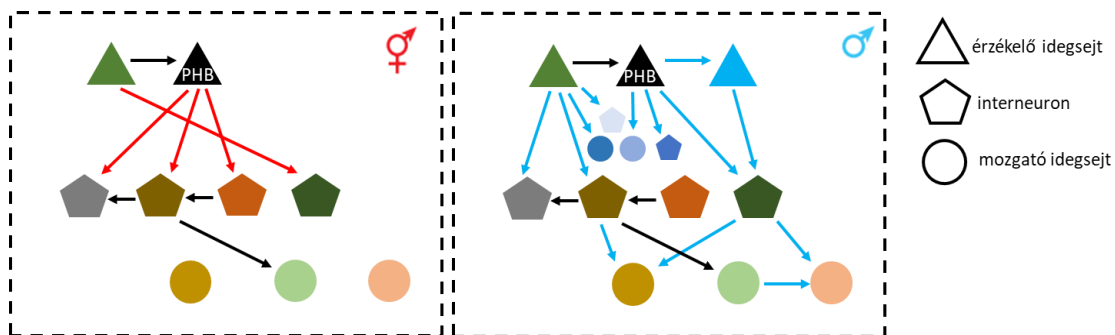
11. ábra. *C. elegans* hermafrodita és hím idegrendszere A hermafrodita idegrendszer 302 idegsejtet tartalmaz, melyből 8 hermafrodita-specifikus. A hímek 385 idegsejtjéből 91 hímspecifikus. 294 idegsejt mindkét nemből egyaránt megtalálható. Számos közös idegsejt és az idegsejtek szinaptikus kapcsolati hálózata is szexuálisan dimorf. (Az ábrán nincs jelölve.) HSN: hermaphrodite specific motor neuron, VC: hermaphrodite specific ventral cord motor, CEM: male specific cephalic neuron, MCM: mystery cells of the male, CA/CP: hím specifikus sejtek a hasdúsláncnál. (Fagan és Portman 2014⁹⁹, módosítva)

A *C. elegans* idegsejtek négy nagyobb fejlődési stádiumban jönnek létre. A legtöbb az embriógenézis során alakul ki, de az L1 és L2 stádiumok végén is van idegsejtképződés. Az L3-L4 állapotokban alakul ki számos hímspecifikus farki neuron és a 2 MCM. A HSN és CEM neuronok mindkét nemből embrionálisan jönnek létre, de még a kikelés előtt szex-specifikus apoptózissal elpusztulnak a megfelelő nemből. Az idegsejtek érése (végleges pozíció elfoglalása, megfelelő szinaptikus kapcsolatok kialakítása) valamivel később következik be. Pár órási felnőtt korban tekinthető véglegesnek az idegrendszer kifejlődése^{16,28,98}.

Számos, mindkét nemből jelen lévő idegsejtről mutatták már ki, hogy a génexpressziós mintázatuk szexuálisan dimorf, és ez viselkedési különbségeket is okozhat²⁹. A hímek táplálékelhagyó-párkereső viselkedésében például annak is szerepe van, hogy nemi különbség van a táplálék érzékelésében. Kemotaxis vizsgálatokban a hímek sokkal kevésbé vonzódnak a táplálékasszociált diacetilhez, mint a hermafroditák. A diacetil legfőbb receptora az ODR-10 (*odorant response abnormal*), amely ivarspecifikus expressziót mutat az AWA (*amphid wing*

cell) érzékelő idegsejtben felnőtt korban¹⁰⁰. Jól táplált hímekben nem fejeződik ki az *odr-10* az AWA-ban, és ennek következtében kevésbé érzékelik a diacetilt. Éhező hímekben azonban újra megjelenik az ODR-10 receptor, és így visszaszorul a táplálékelhagyó-párkereső viselkedés. A példa jól mutatja, hogy egyetlen receptor expressziója milyen fontos szerepet játszhat a táplálkozás és a felfedező viselkedés közötti priorizálásban, mégpedig ivarspecifikus módon^{29,100}.

A nemek szinaptikus kapcsolati hálózata is erősen dimorf^{101,102}. Szexuálisan dimorf szinaptikus kapcsolatok vannak mindkét nemből jelenlévő neuronok között is, melyek így eltérő, ivarspecifikus funkciókat nyerhetnek. A szexuálisan dimorf neuronális kapcsolatok nem egyszerűen hasonló idegrendszeri körök szex-specifikus, apróbb módosításait jelentik, hanem inkább ugyanazoknak a neuronoknak teljesen különböző körökbe történő huzalozását^{50,103}. A mindkét nemből jelenlévő PHB (*phasmid neuron*) érzékelő idegsejt például teljesen különböző szinaptikus kapcsolatokat alakít ki hermafroditákban és hímekben. A szabályozási kör legtöbb idegsejtje mindkét nemből megtalálható, de eltér a közöttük lévő szinaptikus kapcsolati hálózat (12. ábra). Ennek megfelelően a PHB funkciója is szexuálisan dimorf. Hermafroditákban bizonyos káros környezeti jelek érzékelésében és azok elkerülésében van szerepe. Hímekben a PHB idegsejt nem vesz részt ebben az érzékelésben és viselkedésben, hanem a hermafrodita specifikus jelek érzékelésében játszik szerepet¹⁰³.



12. ábra. Ugyanazok az idegsejtek teljesen más szinaptikus szabályozási hálózatot alkothatnak a két nemből. Az ábrán egy érzékelő idegsejt, a PHB (*phasmid neuron*, fekete háromszög) közvetlen és közeli közvetett szinaptikus kapcsolatait látszanak, melyek a két nemből erősen különböznek. Ennek megfelelően a PHB szexuálisan dimorf funkcióval rendelkezik. Feji és farki idegsejtek is szerepelnek az ábrán. Az azonos színű és alakú síkidomok ugyanazt az idegsejtet jelölik a két nemből. Kék síkidomok: hímspecifikus idegsejtek, piros nyilak: hermafrodita-specifikus szinaptikus kapcsolatok, kék nyilak: hímspecifikus szinaptikus kapcsolatok, fekete nyilak: mindkét nemből jelenlévő szinaptikus kapcsolatok. (Oren-Suissa és mtsai., 2016¹⁰³, módosítva)

A mindkét nemben jelen lévő idegsejtek közti szexuálisan dimorf szinaptikus kapcsolatok kialakulását vizsgálva eddig kétféle modellre találtak bizonyítékot. Az egyik lehetőség, hogy már kezdetől szexuálisan dimorf a kapcsolat, és a nemi érés során ez csak megerősödik. A másik, hogy a kezdetben mindkét nemben jelenlévő szinaptikus kapcsolatok a nemi érés során az egyik nemben eltűnnek¹⁰³.

Több bizonyíték is azt mutatja, hogy az egyes neuronok neme sejtautonóm módon határozza meg expressziós mintázatukat és szinaptikus kapcsolataikat^{50,103}. Egyetlen neuron nemének megváltoztatása a szinaptikus kapcsolati hálózat kisebb vagy nagyobb transzformációját okozhatja. Ha az előbb említett PHB idegsejtet például hím nemű sejté alakítjuk (a TRA-1 sejt-specifikus gátlásával) egy hermafroditában, akkor a hímekre jellemző PHB specifikus szinaptikus kapcsolatok alakulnak ki, és a hermafrodita állat a hímekre jellemző viselkedési elemeket mutatja¹⁰³.

3.2. Neurodegeneratív folyamatok autofágia-alapú kezelése *D. melanogaster*-ben

3.2.1. Öregedés és neurodegeneratív betegségek

A neurodegeneratív betegségek csoportjába olyan tömeges neuronpusztulással együtt járó rendellenességeket sorolunk, melyekre jellemző a memóriavesztés, a kognitív és érzékelési leépülés, és a motoros funkciók különböző zavarai¹⁰⁴. Ezek ma még nagyrészt gyógyíthatatlan betegségek, melyek a jelentős testi tünetek és fájdalom mellett fokozott szellemi, mentális és személyiségi változásokkal és leépüléssel társulnak. A neurodegeneratív betegségek is azon betegségek közé tartoznak, melyek kockázata nő az öregedés során. Szinte minden idős ember agya mutat neurodegenerációval összefüggő változásokat, még olyanoké is, akikben nem manifestálódott betegség. A megöregedett agy neuronjaiban magasabb a rosszul feltekeredett fehérjék mennyisége, és alacsonyabb az autofág fenntartó rendszer aktivitása. A neurodegeneratív betegeknél ezek a változások előbb és súlyosabb formában jelennek meg, specifikus agyi régiókban koncentrálódva¹⁰⁵.

3.2.2. Autofágia-alapú terápiás megközelítések neurodegeneratív betegségek kezelésében

A neurodegeneratív betegségek legfőbb közös molekuláris jellemzője, hogy abnormális szerkezetű fehérjékből álló aggregátumok jelennek meg a neuronokban. Egyes esetekben ismert mutációk állnak a betegség hátterében, más esetekben az aggregátum képződés pontos molekuláris háttere ismeretlen. Sokszor az abnormális fehérjék toxikus funkciónyeréses működése okozza a neurodegeneratív folyamatok elindulását, és az idővel egyre jelentősebb aggregátum képződés károsan érinti a sejtek homeosztázisát. A leghatékonyabb kezelési mód a rossz szerkezetű fehérjék mennyiségének csökkentése lenne. Az autofág lebontó folyamat fokozása az oldott és aggregált fehérjék mennyiségét is képes csökkenteni, és ezzel lassítja az öregedést és gátolja a neurodegeneratív folyamatok kialakulását^{106,107}.

3.2.2.1. Az autofágia

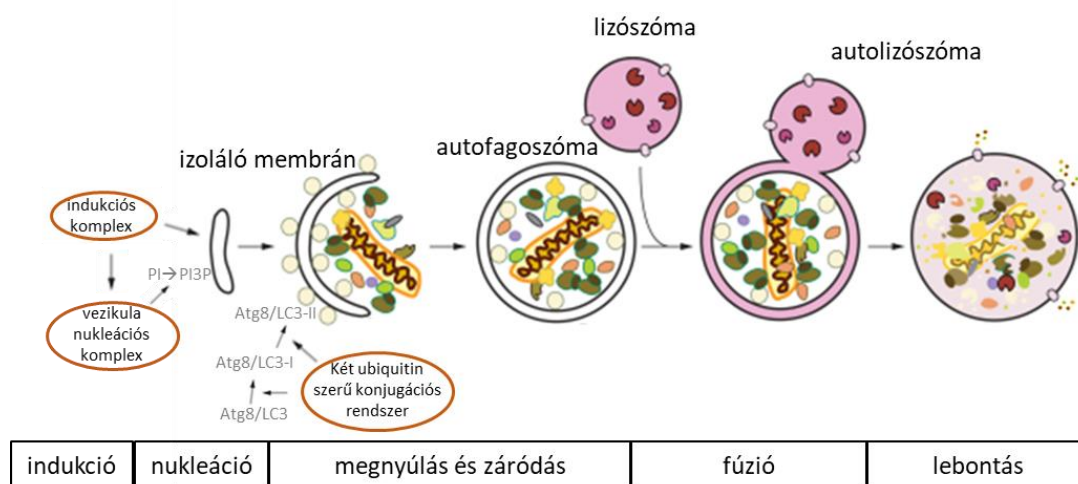
Az autofágia egy konzervált lizoszomális degradációs (katabolikus) útvonal, mely egy dinamikus újra hasznosítási rendszer alapvető eleme, így fontos szerepet játszik a sejtes homeosztázis fenntartásában. Eltávolítja a sejtéből a sérült vagy feleslegessé vált makromolekulákat és sejtservecskéket. Egyúttal energiát és építőelemeket biztosít a felépítő folyamatok számára. Nem csak stressz-körülmények között, hanem a normális életműködés és a fejlődés során is elengedhetetlen működése^{106,108,109}.

3.2.2.1.1. Az autofágia főbb típusai és mechanizmusa

Az autofágia 3 fő típusát különböztetjük meg a lebontandó citoplazma komponensek lizoszómába jutásának módja szerint: mikroautofágia, chaperone-közvetített autofágia és makroautofágia¹⁰⁸. A mikroautofágia során a lizoszóma membránja betűrődik, és így citoplazma részletek invaginációval jutnak be a lizoszóma belsejébe. A chaperone-közvetített autofágia esetén egy KFERQ pentapeptid motívumot tartalmazó, lebontásra szánt fehérjéket chaperone fehérjék ismerik fel és szállítják a lizoszómához, aminek belsejébe egy speciális transzmembrán receptoron keresztül jutnak be. A makroautofágia során először egy izoláló membrán, az ún. fagofór keletkezik a citoplazmában, ez öleli körbe a lebontandó sejtalkotókat. A keletkező kettős membrán záródásával egy autofagoszómának nevezett

vakuólum keletkezik. Az autofagoszóma lizoszómával fuzionálva hozza létre az autolizoszómát, amiben ezután megtörténik az enzimatis leontás^{104,108,109}.

A makroautofágiát, amely a legjelentősebb autofág folyamat, a továbbiakban autofágiaként hivatkozom. Folyamata több lépésre osztható: indukció, autofagoszóma képződés (fagofór nukleációja, membrán növekedése, majd záródása), fúzió lizoszómával, lebontás az autolizoszómában, majd a lizoszómák újraképződése (reciklizáció) (13. ábra). A különböző lépéseket fehérje komplexek irányítják. A komplexek fő alkotóit ún. *Atg* (*autophagy-related*) gének termékei, melyek az élesztőtől emberig igen konzerváltak¹⁰⁹.



13. ábra. A makroautofágia főbb lépései. A makroautofágia során egy úgynevezett izoláló membrán keletkezik, mely körbe öleli a citoplazma egy részét. Az izoláló membrán záródásakor létrejövő autofagoszóma később lizoszómával fuzionál, létrehozva az autolizoszómát, amelyben lizoszómális enzimek bontják le a beltartalmat. A lebontás során keletkezett termékek aktív transzporttal visszajutnak a citoplazmába, ahol újra felhasználásra kerülhetnek. Az autofagoszóma képződés egyes lépéseit különböző komplexek irányítják, melyek fő alkotói a különböző ATG (*autophagy-related*) fehérjék. Az autofágia indukciójában, az izoláló membrán nukleációjában és megnyúlásában szerepet játszó fehérjekomplexek már elég jól jellemzettek (az ábrán barna ellipszissel vannak sematikususan jelölve). Az ábrán csak két molekulát (PI3P és Atg8/LC3) emeltem ki külön, mert ezekről részletesebben szó esik a disszertációban. A vezikula nukleációs komplex iniciálja a PI (*phosphatidylinositol*) → PI3P (foszfatidilinozitol-3-foszfát) átalakulást, mely nélkülözhetetlen az izoláló membrán kialakulásához. Az Atg8/LC3 fehérje először hasítódik (Atg8/LC3-I forma), majd két, ubikvitin-konjugációs enzimrendszerhez hasonló komplex segítségével az izoláló membrán mindkét oldalához kovalensen kapcsolódik (Atg8/LC3-II konjugált forma). Az autofagoszóma létrejöttékor a külső membránról eltávolítódik, míg a belső membránon megmarad egészen addig, míg az autolizoszómában végbemenő emésztés során a belső membrán degradációra nem kerül. (Ariosa és Klionsky, 2016¹⁰⁹ és Billes, 2017¹¹⁰, alapján módosítva)

Az indukciós lépésben az ún. indukciós komplex (Atg1/Ulk1, Atg13, Atg17/Fip200, Atg101 fehérjék) játszik fontos szerepet. Ez a komplex szabályozza a membrán toborzáshoz szükséges Atg9-et, és aktiválja a vezikula nukleációs komplexet (Vps34/PI3KC3, Vps15/p150, Atg6/Beclin1, Atg14/Atg14L fehérjék). Az utóbbi komplex a PI (foszfatidilinozitol) → PI3P (foszfatidilinozitol-3-foszfát) átalakulást katalizálja. A PI3P nélkülözhetetlen a fagofór képződéséhez és éréséhez. A fagofór kettős membránja mai állás szerint elsősorban endoplazmatikus retikulum eredetű, de növekedésében a Golgi apparátusból, mitokondriumból és plazmamembránból származó membránrészek is részt vehetnek^{106,108–110}.

Az izoláló membrán növekedéséhez és autofagoszómává záródásához ubikvitinszerű konjugációs rendszerek szükségesek. Működésének eredményeként az Atg8/LC3 kovalensen köt az izoláló membrán mindkét oldalán jelenlevő foszfatidil-etanolaminhoz. Az Atg8/LC3 fehérjét először az Atg4 fehérje hasítja C terminálisan (Atg8/LC3-I), majd az Atg7 E1-szerű enzim aktiválja, és így kapcsolódik az Atg3 E2-szerű konjugációs enzimhez. Az Atg7 és Atg10 E1- és E2-szerű enzimek segítségével irreverzibilis kötés alakul ki az Atg2 és Atg5 között, majd ezek az Atg16-tal egy komplexet alakítanak ki. Az Atg2-Atg5-Atg16 komplex egy E3-szerű ligáz enzimként működve köti az aktivált Atg8/LC3-I-et a membránban jelenlevő foszfatidil-etanolaminhoz, így jön létre az aktív Atg8/LC3-II. Az autofagoszóma záródáskor az Atg8/LC3-II-t az Atg4 lehasítja a külső membránról. A belső membránon viszont megmarad egészen az autolizoszómában végbemenő emésztésig, míg végül a belső membrán is lebontásra kerül^{104,106,108,109}. Az autofagoszómák a kialakulásuk után lizoszómákhoz szállítódnak és fuzionálnak velük. A lizoszomális enzimek lebontják a beltartalmat a belső membránt is beleértve. A keletkező, még hasznosítható termékek aktívan kipumpálódnak a citoszolba, ahol újra felhasználásra kerülhetnek¹⁰⁹.

Az autofágia történhet nem szelektív és szelektív módon is. Nem szelektív autofágia esetén az izoláló membrán véletlenszerűen ölel körül bizonyos citoplazma részeket. Ez a folyamat alapszinten zajlik a sejtekben, hozzájárulva a citoplazma komponensek természetes megújulásához. Éhezés esetén fokozódik a bazális autofágia szintje. Szelektív autofágia esetén a lebontásra szánt sejtalkotókat (pl. ubikvitinált fehérjék, sérült sejtservecskék, citoplazmatikus baktériumok) az ún. autofág receptorok kapcsolják az izoláló membránhoz. Az autofág receptorok is lebomlanak az autolizoszómában az általuk odairányított

sejtalkotókkal együtt. A receptorok közül az egyik legjelentősebb a p62/SQSTM1/Ref (2)P, mely a membránkötött Atg8/LC3-II-höz képes kötődni^{108,111}.

3.2.2.1.2. Autofágia öregedő idegsejtekben

A neuronok különösen érzékenyek a károsodott, feleslegessé vált fehérjék és sejtszervecskék felhalmozódására, aggregálódására. A posztmitotikus neuronokban a sérült fehérjék és sejtszervecskék nem tudnak „kihígulni” a sejtsztódás hiánya miatt. A neuronok ráadásul erősen polarizál struktúrájú sejtek; az axonok és dendritek messze elnyúlhatnak a sejttesttől, ami nehezítheti a szállítási folyamatokat, egyes részeik pedig különösen gyors és precíz fehérje forgalmat igényelnek. Az autofágia folyamata különösen fontos a neuronok homeosztázisának fenntartásában^{104,106,109}. Az öregedési folyamat során fokozatosan csökken az autofág és a proteasomális aktivitás, melynek szerepe lehet a szövetek fokozatos funkcionális leromlásában. Az idegsejtekben poliubikvitinált fehérjékből álló aggregátumok jelenhetnek meg, amely az autofág folyamat funkcionális csökkenésének következménye lehet. A zárványok száma és mérete is növekedhet életkorral. A neurodegeneratív betegségek többségében még fokozottabb az abnormalis fehérjékből álló aggregátumok megjelenése és szinte mindegyik esetében sérül az autofágia folyamata.¹⁰⁶

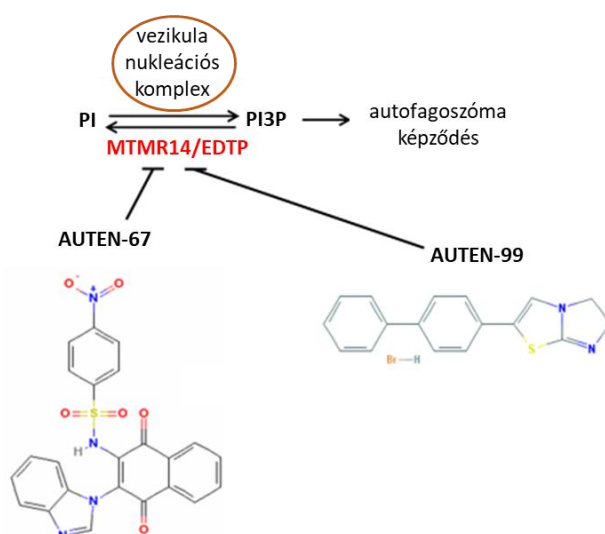
3.2.2.1.3. Autofágia-alapú terápiás megközelítések

Az autofág aktivitás farmakológiai fokozása a neurodegeneratív betegségek kezelésére (és az öregedés lassítására) kiemelt figyelmet kap a jelenlegi gyógyszerfejlesztési kutatásokban. Többféle autofágia indukáló molekula áll jelenleg fejlesztés alatt. Azonban a célba vett molekulák és útvonalak viszonylag távoli szabályozói az autofágiának, így ezek a szerek számos más sejtfolyamatra is hatással lehetnek, ami nem kívánt mellékhatásokhoz vezethet¹⁰⁶.

3.2.2.1.4. Autofágiát szabályozó új kismolekulák, AUTEN-67 és AUTEN-99

Az izoláló membrán nukleációjához nélkülözhetetlen a PI3P. A vezikula nukleációs komplex katalizálja a szükséges PI → PI3P átalakulást (14. ábra). Ez egy reverzibilis folyamat, a PI3P → PI átalakulást szubsztrát specificitásuk alapján myotubularin típusú lipid foszfatázok

katalizálják. Emlősökben és *Drosophilában* az MTMR14 (*myotubularin-related*) és EDTP (*egg-derived tyrosine phosphatase*) funkcionál ilyen lipid foszfatazként (12. ábra). A $PI \rightarrow PI3P$ és $PI3P \rightarrow PI$ átalakulás szabályozásával modulálható az autofágia. Az alacsony $PI3P$ szint gátolja az autofágiát, míg a magas $PI3P$ szint serkenti az autofagoszóma képződést. A $PI3P$ jelenlegi ismereteink szerint csak az autofágia és az endocitózis folyamataiban vesz részt, de az MTMR14 nem található meg korai endoszómákon humán makrofágokban¹¹⁰. Az MTMR14 vázizomban még a $PI3,5P_2$ -t (foszfatidilinozitol-3,5-biszfoszfát) is képes defoszforilálni. Az MTMR14 nagymértékben konzervált, szinte az összes fajban megtalálható¹¹⁰. Az MTMR14 egy potenciális terápiás célpont lehet az autofágia specifikus indukálására.



14. ábra. Az AUTEN-67 és AUTEN-99 kismolekulák az MTMR14 gátlásán keresztül fokozzák az autofágiát. A $PI3P$ megfelelő mennyisége nélkülözhetetlen az autofagoszóma képződéshez. Az MTMR14 a $PI3P$ defoszforilálásával csökkenti annak mennyiségét, ezáltal gátolja az autofágia folyamatát. Két nemrégiben azonosított kismolekula, az AUTEN-67 (*autophagy enhancer* – autofágia fokozó) és AUTEN-99 az MTMR14 gátlásán keresztül képes fokozni az autofág aktivitást, így potenciális terápiás szerek. (Billes, 2017¹¹², módosítva)

Papp és mtsai. szűrővizsgálatot végeztek egy kismolekulákat tartalmazó könyvtárral, hogy specifikus MTMR14 gátlókat találjanak¹¹³. Két ilyen kismolekulát, AUTEN-67 és AUTEN-99 (*autophagy enhancer*), izoláltak és jellemezték. Ezek potenciális terápiás szerré válhatnak a jövőben (14. ábra). Mindkét molekula koncentráció-függő módon gátolja az MTMR14-et, és növeli az autofág aktivitást emlős sejtkultúrában és *in vivo Drosophila* és egér modellekben^{113,114}. Doktori munkám során ezen kismolekulák hatását vizsgáltam meg

Drosophila Huntington-kór (*Huntington disease* - HD) modellben. Az emberi agy egy rendkívül komplex szerv, ezért érdemes először egyszerűbb modellekben (pl. *C. elegans* és *D. melanogaster*) vizsgálni az alapvető neurobiológiai folyamatokat és terápiás szerek hatását¹¹⁵. Az AUTEN-ek hatásának vizsgálatára a *Drosophilát* választottuk. Ennek oka, hogy az autofágia vizsgálatára szolgáló molekuláris eszköztár (pl. riporterek) jól kidolgozott ebben a modellszervezetben.

3.2.3. *Drosophila* neurodegeneratív betegség modellek

3.2.3.1. A *Drosophila melanogaster* általános jellemzése

A *D. melanogaster* (ecetmuslica) a *Dipterák* (kétszárnyúak) rendjébe és a *Drosophilidae* (harmatlégyfélék) családjába tartozó kistestű rovar. Széles körben elterjedt a természetben. A vadon élő egyedek élesztővel, baktériumokkal és növényi anyagokkal táplálkoznak, melyeket főleg érett vagy rothadó gyümölcsökből nyernek. Először William Castle használta kutatásához 1900-ben, de igazi genetikai modellszervezetté csak egy évtizeddel később, a Thomas Hunt Morgan által vezetett kutatócsoport munkájának eredményeként vált. Mára az egyik legkedveltebb genetikai modellszervezet. Elsősorban sejt- és fejlődéstani, neurobiológiai, viselkedési, molekuláris, valamint evolúciós és populációgenetikai vizsgálatokban alkalmazzák¹¹⁶. Kisméretű, laboratóriumban könnyen fenntartható, sok utódja van. Életciklusa gyors, 25°C-on kb. 9-10 nap alatt fejlődik ki. Három lárvastádiuma van, melyeket vedlések választanak el egymástól, ezek után bebábozódik, majd metamorfózison át fejlődik ki a rovar. Maximális élettartama kb. 90 nap 25°C-on¹¹⁷. A *C. elegans* mellett a *D. melanogaster* az öregedési kutatások másik legjelentősebb gerinctelen modellje. *C. elegans*-szal összehasonlítva nemcsak több szövettípussal rendelkezik, de ezek nagyobb méretűek és könnyebben vizsgálhatók. Természetes populációkban nőtény (XX kariotípus) és hím (XY kariotípus) állatok egyaránt megtalálhatók. *Drosophila*-ban is az X kromoszómák száma a nem elsődleges meghatározója (az XO állatok hímként fejlődnek)¹¹⁶.

Az állat szomatikus sejtjeiben 3 pár autoszóma található. Genomja kb. 180 Mb nagyságú, ebből 120 Mb az eukromatin (aktív) állomány. A *D. melanogaster* volt a második többsejtű élőlény, melynek teljes genomját megszekvenálták¹¹⁸. Mára kb. 24-féle, igen változatos tulajdonságokkal rendelkező *Drosophila* fajnak határozták meg a genomját, ami lehetővé teszi

az összehasonlító vizsgálatokat is. Genetikailag könnyen manipulálható és számos ortológ génnek van szerepe humán betegségekben. Számos területen (például autofágia) rendkívül kifinomult módszerek segítik a genetikai kutatásokat¹¹⁶. Több *Drosophila* törzsbank is létezik a világban, ezek közül a legfontosabb a bloomingtoni (*Bloomington Drosophila Stock Center*). Számos internetes adatbázis szolgál a különböző *Drosophila* kutatások eredményeinek összefoglalására, közülük a legjelentősebb FlyBase (<http://flybase.org>)¹¹⁶.

3.2.3.1.1. Neurodegeneratív betegség modellek *Drosophila*-ban

A *Drosophila* központi idegrendszere számos funkcionális, fejlődési és molekuláris hasonlóságot mutat az emberével¹¹⁵. Neurodegeneratív betegséggel kapcsolt humán gének ortológia általában megtalálhatók *Drosophila*-ban, melyek kiütése viselkedési, mozgási, érzékelési és különböző neurodegeneratív tüneteket okozhat. Ezek molekuláris és patológiás szinten is hasonlítanak az emberi betegségekre. Azonban vannak olyan betegségek is, melyeknél a gének nem mutatnak nagyfokú homológiát. A ma használt legtöbb *Drosophila* neurodegeneratív modell transzgénikus rendszer, melyben a megfelelő humán mutáns fehérjét fejeztetik ki, leggyakrabban a bináris UAS-Gal4 rendszer segítségével. Mára a legfontosabb neurodegeneratív betegségek rendelkeznek olyan *Drosophila* modellel, melyek mutatják a humán betegség legtöbb aspektusát és tünetét^{115,119}.

3.2.4. A Huntington-kór

A HD egy lassan kifejlődő, halálos kimenetelű neurodegeneratív betegség. Széles spektrumú motoros, szellemi és pszichiátriai tüneteket okoz. 100 000 emberből 5-8-at érint^{120–122}.

3.2.4.1. A Huntington-kór genetikai háttere

A HD autoszomális, domináns öröklődésű (a legtöbb érintett heterozigóta), az ún. poliglutamin (polyQ) betegségek közé tartozik. A *Huntingtin* (*HTT* vagy *IT15*) gén első exonjában található CAG (glutamint kódoló triplet) ismétlődésekből álló szekvenciát érintő mutáció felelős a HD kialakulásáért. Ha a CAG ismétlődések száma nagy, a szekvencia meiotikusan instabillá válik, és patológiás mértékben meghosszabbodhat. A patológiásan megnyúlt poliglutamin (poliQ) szakaszt tartalmazó mutáns HTT fehérje szerkezete,

oldhatósága és funkcionalitása megváltozik, perinukleáris citoplazmatikus aggregátumokat és intranukleáris zárványokat képez bizonyos agyterületeken, és többféle módon is toxikus hatást fejt ki (15. ábra). Egészséges emberekben a *HTT* gén 6-35 CAG ismétlési számot tartalmaz, a 35-nél több CAG ismétlés patológiás¹²⁰. Minél nagyobb az ismétlések száma, annál korábban és annál súlyosabb tünetek jelennek meg. A ritka homozigótákban a betegség progressziója súlyosabb. A *Htt* gén konzervált *Drosophila*-tól az emberig¹²².

3.2.4.2. Tünetek és terápiás lehetőségek

A betegség általában felnőtt korban (20-65 éves) alakul ki¹²¹, és hosszantartó (10-20 év), progresszív lefolyású. Az egyre súlyosbodó tünetek zavarják, majd megakadályozzák a normális életvitelt. A kezdeti apróbb mozgáskoordinációs problémákat akaratlan, egyre fokozódó, az egész testre kiterjedő vándorló- és a szemmozgások jellegzetes zavara váltja fel. A későbbi stádiumokban merevség, akaratlan tartós izomösszehúzódások alakulnak ki. Megváltozhat a beteg személyisége, viselkedése, valamint neurofiziológiai és pszichiátriai tünetek jelennek meg (pl.: depresszió, szorongás, szégyenérzés elvesztése, ingerlékenység, skizofrénia-szerű tünetek). Általában a nyelési nehézségek miatt kialakuló tüdőgyulladás és szövődései vezetnek a halálhoz¹²⁰.

A jelenlegi kezelések a tünetek enyhítésére szolgálnak, illetve általános neuroprotektív hatásúak. Nincs olyan kezelés, mely lassítani tudná az általános leépülési folyamatot. Az egyes tünetek ellen külön-külön léteznek többé-kevésbé hatásos farmakológiai gyógyszerek, azonban számos mellékhatásuk lehet, akár fel is erősíthetik a többi tünetet¹²¹.

3.2.4.3. A HTT fehérje

A HTT fehérje számos szövettípusban van jelen, legnagyobb mennyiségben az agyban. Nélkülözhetetlen a fejlődéshez, többek között az idegrendszer kialakulásához. Több izoformája és proteolitikus variánsa létezik, számos poszttranszlációs módosításon eshet át, és többféle konformációban található meg. Elsősorban a citoplazmában lokalizálódik, de a sejtmagban is jelen van. Mára több mint 350 interakciós partnere ismert, és számos folyamatban leírták szerepét¹²². A HTT kölcsönhat a molekuláris motor apparátussal, számos

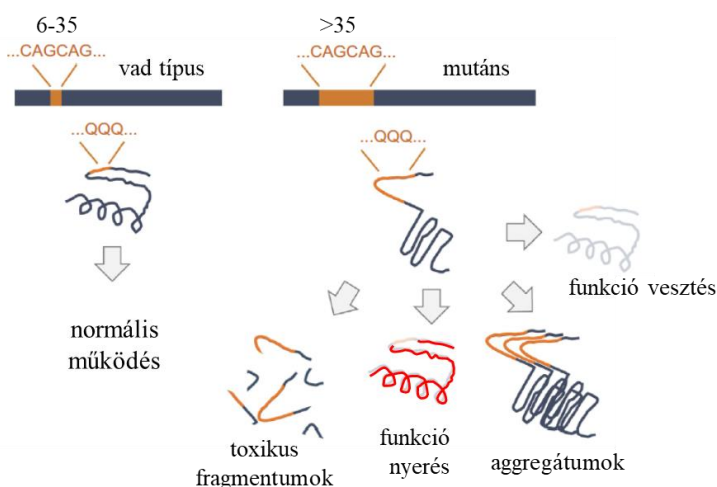
vezikula és organelum transzportjához kell antero és retrográd irányban az idegsejtek axonjaiban és dendritjeiben. Szükséges a mitózis folyamatához neuroblasztokban és nem idegsejtekben, valamint a csilló képződéshez és működéshez. Több ponton hat az endocitózis folyamatára. A szelektív autofágia folyamatában is szerepe van szerkezeti fehérjeként, valamint az autofagoszómák axonokon belüli retrográd szállításában, illetve az autofagoszóma-autolizoszóma átmenet során. Szükséges lehet az autofágia indukciójához és az ubikvitinált fehérjék autofagoszómába juttatásához is. A transzkripció szabályozásán át számos sejtbiológiai folyamatra (például sejtciklus, DNS hibajavítás, apoptózis, sejtes stresszválaszok) hatással van. Több transzkripciós faktor szerepel az interakciós partnerei közt, szerepe lehet a szubcelluláris lokalizációjuk kialakításában, valamint szerkezeti fehérjeként is részt vehet a transzkripció szabályozásában, a kromatin szerveződést is képes szabályozni^{122,123}.

3.2.4.4. Mutáns HTT fehérje

A mutáns HTT fehérje komplex módon járul hozzá a HD molekuláris és patológiás tüneteinek kialakulásához (15. ábra). Gyakran proteolitikusan hasítódik, és különböző hosszúságú N terminális (patológiás poliQ szakaszt tartalmazó) és C terminális fragmentumok keletkeznek belőle. Az N terminális fragmentumok a sejtmagba jutva toxikusak, domináns-negatív hatást gyakorolnak a transzkripcióra, és idegsejt pusztulásához vezetnek. Minél rövidebbek, annál toxikusabbak. A C terminális fragmentumok is toxikusak, több citoplazmatikus folyamatban negatív hatásuk van¹²². A mutáns HTT fehérjéből és fragmentumaiból létrejövő aggregátumok kezdetben sejtvédő funkciót töltenek be, mivel csökkentik az oldott formában jelenlévő toxikus fragmentumok mennyiségét. A nagy mennyiségben jelen lévő aggregátumok azonban már zavarják a sejtes homeosztázist¹²². Egyes folyamatokban a mutáns HTT fehérje új funkciót nyerhet vagy teljesen elveszítheti funkcionálisát. Az utóbbi esetben a vad-típusú HTT fehérje funkciócsökkenéses hatása jelenik meg a fenotípusban, mivel a legtöbb beteg heterozigóta¹²².

A mutáns HTT túltermeltetése gátolja a proteasomális és az autofág lebontást, mitokondriális abnormalitásokat (és ehhez kapcsolódóan energetikai- és anyagcserezavarokat) okoz, hatására

megváltozik az endocitózis és a vezikuláris transzport, transzkripció zavarok jelennek meg, a kalcium jelátvitel fokozódik, és a szinaptikus működés károsodik¹²².



15. ábra. A mutáns HTT fehérje komplex módon járul hozzá a HD molekuláris tüneteinek kialakulásához. Ha a *Htt* génben a CAG ismétlődések száma 35-nél nagyobb, a szekvencia meiotikusan instabillá válik és patológiás mértékben meghosszabbodhat. A patológiás hosszúságú poliQ szakaszt tartalmazó mutáns HTT fehérje gyakran proteolitikusan hasítódik és toxikus fragmentumok keletkeznek. A mutáns HTT fehérjéből és fragmentumaiból aggregátumok képződnek, melyek kezdetben sejtvédő funkciójúak, azonban felszaporodva zavarják a sejtes homeosztázist. A mutáns fehérje elvesztheti funkcionálisát vagy akár új funkciókat is nyerhet. CAG: glutatmint kódoló triplet, Q: glutamin. (Krench és Littleton 2017¹²⁴, módosítva)

3.2.4.5. *Drosophila* HD modellek

A HD modellek *Drosophila*-ban olyan transzgénikus állatok, melyekben a *Htt* gén patológiásan hosszú CAG ismétlődéseket tartalmazó változatát fejeztetik ki. Ez önmagában elég, hogy kialakítsa a humán betegség fontosabb tüneteit, melyek a polyQ szakasz hosszától függően különböző erősségűek. A korai lárva stádiumokban nincs megfigyelhető változás, csak a késői lárva stádiumokban és felnőtt korban jelentkeznek a tünetek. Romlanak a motoros funkciók, a humán betegségre jellemző molekuláris és sejtes változások indulnak be, fehérje aggregátumok jönnek létre, és neurondegeneráció következik be. A neuropatológia progresszív jellegű és élettartamuk is rövidebb¹²⁵.

4. Célkitűzések

4.1. Az öregedés és az idegrendszer ivarspecifikus szabályozásának vizsgálata

Az ivari dimorfizmus igen elterjedt az állatvilágban, azonban az esetek többségében nem tudjuk, hogy pontosan milyen molekuláris mechanizmusok alakítják ki a nemi különbségeket. Ennek vizsgálatára kitűnő modell a *C. elegans*, melynek két neme (hermafroditák és hímek) között számos különbség figyelhető meg. *C. elegans*-ban a szex-determinációs útvonal transzkripciós faktorának, a TRA-1-nek az aktivitása áll minden nemi különbség hátterében. Csoportunk korábban meghatározta a *C. elegans* genomban található potenciális TRA-1 célgének listáját. Doktori munkám során két jelöltet, a *daf-16/FoxO*-t és a *goa-1/Gi/o*-t kívántam ezek közül vizsgálni.

A *daf-16* az öregedési folyamat egyik fontos szabályozója. Doktori munkám során arra kerestem a választ, hogy a TRA-1 a *daf-16* közvetlen szabályozásával alakítja-e ki a megfigyelt nemi különbségeket az élettartamban.

Részletes célkitűzéseink ebben az altémában (főbb kérdések):

- A *daf-16*-nak szerepe van-e az élettartamban megfigyelhető nemi különbségek kialakításában?
- A *C. elegans* szex-determinációs útvonal szabályozza-e az élettartamot, és ez *daf-16*-függő folyamat-e?
- A TRA-1 az általunk talált kötőhelyen át szabályozza-e a *daf-16* transzkripcióját?
- A *daf-16d/f* izoforma különböző mennyisége alakítja-e ki az élettartam nemi különbségeit?
- A talált szabályozási kapcsolat konzervált lehet-e *C. elegans* és ember között?

A *goa-1/Gi/o* gén számos idegrendszeri funkciót és viselkedési elemet szabályoz. Munkánk során kimutattuk, hogy felnőtt állatokban a TRA-1 a talált kötőhelyen át közvetlenül gátolja a *goa-1* transzkripcióját, és ezen keresztül nemi különbségeket alakít ki a viselkedésben. (Ezek az eredmények Kutnyánszky Vera doktori disszertációjában¹²⁶ kerülnek kifejtésre.) Az általunk készített *goa-1* riporter konstrukció elemzése során azonban azt tapasztaltuk, hogy embrionális korban nagyobb expressziós különbségek figyelhetők meg, mint felnőtt korban.

különböző mutáns hátterekben. Ezért meg kívántuk vizsgálni azt is, hogy a talált szabályozási kapcsolat kialakíthat-e nemi különbségeket az idegrendszer embrionális fejlődése során.

Részletes célítúzéseink ebben az altémában (főbb kérdések):

- A TRA-1 már embrionálisan is nemi különbségeket alakít-e ki a *goa-1* expressziójában a csoportunk által talált kötőhelyen át?
- A *goa-1* aktivitás változása befolyásolja-e az idegrendszer nemi identitását?

4.2. Neurodegeneratív betegségek kezelése autofágia indukáló gyógyszerjelöltekkel

Az öregedés során fokozatosan nő számos betegség, köztük a neurodegeneratív elváltozások kockázata is. Az autofágia aktiválása az egyik leghatékonyabb potenciális terápiás eljárás ezen betegségek esetében. A jelenleg használt autofágia fokozó hatóanyagok célpontjai azonban csak távoli szabályozói az autofágiának, és számos más sejtes folyamatban is szerepük van. Ezen szerek alkalmazása ezért számos mellékhatást okozhat. Az autofágiát gátló lipid foszfatáz MTMR14 potenciális terápiás célmolekula lehet az autofágia farmakológiai aktiválásában. Doktori munkám során részt vettem két MTMR14 gátló kismolekula (AUTEN-67 és AUTEN-99) hatásának vizsgálatában *Drosophila* HD modellben. A jelen dolgozatban is szereplő kísérleteknél a célunk az volt, hogy meghatározzuk vajon a vizsgált kismolekulák hatnak-e, és ha igen hogyan, és mely lépésben az autofágia folyamatára *Drosophila* HD modellek agyában.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Felhasznált törzsek

5.1.1. *Escherichia coli* törzsek

OP50: uracil auxotróf *E. coli*, a *C. elegans* törzsek táplálékául szolgáló törzs.

HT115(DE3): az „etetéses” RNS interferenciához használt *E. coli* törzs. Genotípusa: *F*-, *mcrA*, *mcrB*, *IN (rrnD- rrnE)1*, *rnc14::Tn10(DE3)* lizogén: *lavUV5* promóter -T7 polimeráz) (IPTG indukálható T7 polimeráz) (RNáz III).

DH5α: *fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* genotípusú törzs.

NA22: gyorsan növő, vastag baktériumpázsitot kialakító *E. coli* törzs. Transzgénikus törzsek létrehozásához szükséges nagy mennyiségű *unc-119(ed3)* mutáns *C. elegans* felszaporításakor szolgál táplálékul.

5.1.2. *C. elegans* törzsek (név, genotípus)

CGC-től vásárolt, vagy munkatársak által létrehozott:

Bristol (N2), vad-típus

TTV395 *tra-1(e1099)/hT2qIs48(I)III*;

CB2823 *tra-1(e1488)III/eDp6(III);f*;

CB3769 *tra-1(e1575)/+III*; *tra-3(e1767)IV*;

CB3844 *fem-3(e2006)IV*;

CB1370 *daf-2(e1370)III*;

DR1572 *daf-2(e1368)III*;

CF1038 *daf-16(mu86)I*;

GR1307 *daf-16(mgDf50)I*;

HT1890 *daf-2(e1370)III*; *daf-16(mgDf50)I*;

HT1889 *daf-16(mgDf50)I*; *unc-119(ed3)III*; *lpIs14*;

DG1856 *goa-1(sa734)I*;

PS1493 *dpy-20(e1362)IV*; *syIs9[(pMH86)dpy-20(+)+pJMGQL]*;

CB4088 *him-5(e1490)V*;

TTV416 *unc-119(ed3)III*; *eluIs306(pgoa-1::GOA-1::GFP)*;

TTV413 *unc-119(ed3)III*; *eluIs307(pgoa-1::mutGOA-1::GFP)*;

TTV414 *unc-119(ed-3)III*; *him-5(e1490)V*; *eluIs306(pgoa-1::GOA-1::GFP)*;

TTV411 *tra-1(e1099)/unc-119(ed-3)III*; *eluIs306(pgoa-1::GOA-1::GFP)*;

TTV412 *fem-3(e2006)IV*; *unc-119(ed-3)*; *eluIs306(pgoa-1::GOA-1::GFP)*;

TTV415 *unc-119(ed3)III*; *him-5(e1490)V*; *eluIs307(pgoa-1::mutGOA-1::GFP)*;

EM905 *rax-5(bs137) II*; *him-5(e1490) V*; *bxIs14[pkd-2::GFP + pdx-1]*

Általam létrehozott (keresztelés és/vagy transzgénikus) törzsek:

TTV522 *daf-2(e1370)III*; *daf-16(mu86)I*;

TTV600 *tra-1(e1488)/+*, *daf-2(e1370)III*;

TTV344 *tra-1(e1488)/+*, *daf-2(e1368)III*;

TTV309 *fem-3(e2006)IV*; *daf-2(e1370)III*;

TTV323 *fem-3(e2006)IV; daf-2(e1368)III*;
 TTV338 *fem-3(e2006)IV; daf-16(mu86)I*;
 TTV337 *tra-1(e1575)/+III; tra-3(e1767)IV; daf-16(mu86)I*;
 TTV310 *unc-119(ed3)III; eluIs300[Pdaf-16d/f::gfp+unc-119(+)]*;
 TTV336 *unc-119(ed3)III; eluIs302[PΔdaf-16d/f::gfp+unc-119(+)]*;
 TTV318 *tra-1(e1488)/+III; unc-119(ed3)III; eluIs300[Pdaf-16d/f::gfp+unc-119(+)]*;
 TTV341 *tra-1(e1099)/hT2qIs48(I)III; unc-119(ed3)III; eluIs300[Pdaf-16d/f::gfp+unc-119(+)]*;
 TTV347 *tra-1(e1575)/+III; unc-119(ed3)III; tra-3(e1767)IV; eluIs300[Pdaf-16d/f::gfp+unc-119(+)]*;
 TTV340 *fem-3(e2006)IV; unc-119(ed3)III; eluIs300[Pdaf-16d/f::gfp+unc-119(+)]*;
 TTV329 *him-5(e1490)V; unc-119(ed3)III; eluIs300[Pdaf-16d/f::gfp+unc-119(+)]*;
 TTV321 *tra-1(e1488)/unc-119(ed3)III; eluIs302[PΔdaf-16d/f::gfp+unc-119(+)]*;
 TTV469 *tra-1(e1099)/unc-119(ed3)III; eluIs302[PΔdaf-16d/f::gfp+unc-119(+)]*;
 TTV327 *fem-3(e2006)IV; unc-119(ed3)III; eluIs302[PΔdaf-16d/f::gfp+unc-119(+)]*;
 TTV645 *tra-1(e1099)/unc-119(ed3)III; eluIs307(pgoa-1::mutGOA-1::GFP)*;
 TTV655 *fem-3(e2006)IV; unc-119(ed3)III; eluIs307(pgoa-1::mutGOA-1::GFP)*;
 TTV688 *him-5(e1490)V; bxIs14[pkd-2::GFP + pdx-1]*;
 TTV689 *goa-1(sa734)I; him-5(e1490)V; bxIs14[pkd-2::GFP + pdx-1(pha-1)]*;
 TTV690 *goa-1(syIs9)I; him-5(e1490)V; bxIs14[pkd-2::GFP + pdx-1(pha-1)]*

5.1.3. *D. melanogaster* törzsek

BL32040 *Appl-Gal4 I, y1, w** (pánneurális);
 BL33810 *w¹¹¹⁸ I, UAS-16Q-HTT/CyO II*.
 BL33808 *w¹¹¹⁸ I, UAS-128Q-HTT III*.

A munkánk során használt *Drosophila* törzseket a bloomingtoni törzsközpontból (*Bloomington Drosophila Stock Center*) rendeltük.

5.2. *C. elegans* törzsfenntartás

A törzsek fenntartását Brenner alapító *Genetics* cikke szerint végeztem el². A *C. elegans* törzsek fenntartása agar tartalmú NGM (*Nematoda Growth Medium*) táptalajt tartalmazó műanyag petri csészékben történik 15-25°C közötti hőmérsékleten. Az állatok tápláléka a táptalajon növény *E. coli* baktériumpázsit. Az állatok egyesével áthelyezhetők platinatű segítségével új lemezre, míg nagyobb mennyiségű állat egyidejű mozgatása kisméretű spatulával kivágott agar darabok áthelyezésével vagy az állatok lemezről való lemosásával történik. A törzsek hosszabb távon (évekig) tárolhatók -80°C-on vagy folyékony N₂-ben lefagyasztva.

5.2.1. Táptalajok

Baktérium növesztéshez-fenntartáshoz

Folyékony LB tápoldat összetétele: 5 g élesztő kivonat, 10 g Tripton, 10 g NaCl, 1 l biDW. Autoklávozással sterilizáljuk az oldatot. Ha szükséges, lehűlt állapotban antibiotikumokat adunk hozzá.

Szilárd LB táptalaj: 2,5 g élesztő kivonat, 5 g Tripton, 5 g NaCl, 7,5 g agar, 1 l biDW

Autoklávozással sterilizáljuk az oldatot. Ha szükséges, akkor lehűlt, de még nem megdermedt állapotban antibiotikumokat adunk hozzá.

Folyékony SOB tápoldat: 20 g Tripton, 0,58 g NaCl, 10 ml 1M MgCl₂, 5 g élesztő kivonat, 0,19 g KCl, 10 ml 1M MgSO₄, annyi biDW hozzáadása, hogy a végtérfogat 1 l legyen, majd pH-t 6,0-7,0 közé állítjuk be. Autoklávozással sterilizáljuk.

C. elegans fenntartáshoz, speciális mérésekhez

NGM táptalaj összetétele (1 l): 3 g NaCl, 17 g agar, 2,5 g pepton, 1 ml koleszterin (5 mg/ml, EtOH-ban), 975 ml biDW. Autoklávozás, majd amikor lehűlt 60°C-ra a médium, sterilen hozzáadni a következő komponenseket: 1 ml 1M CaCl₂, 1 ml 1M MgSO₄, 25 ml 1M KH₂PO₃ (pH=6,0).

Speciális NGM lemez élettartam mérésekhez (FUdR-os lemez):

Annyiban különbözik az NGM lemez alapváltozatától, hogy az autoklávozás után 60°C-ra hűlt oldathoz a sók mellett FUdR-t (5-fluoro-2'-deoxiuridin) is adunk a 300-400 µg/ml végkoncentrációban. A FUdR a DNS szintézist, és ebből következően a sejtosztódást gátolja. A csírasejtek osztódásának leállása miatt az állatok sterillé válnak. Gyakran alkalmazzák élettartam mérésekhez, mivel így a vizsgált állatok utódnemzedékének hiányában a generációk nem keverednek. Használatára azért volt szükség, mert a *tra-1(e1488)* mutáns állatok különben a „bag of worm” („egy zsáknyi kukac”) fenotípust mutatják, ami az állatok korai (nem öregedés miatti) pusztulásához vezet (lásd a 5.4. fejezetet). Mivel a FUdR a baktériumsejtek osztódását is gátolja, így hosszabb távú (például élettartam) mérésekhez vastagabb baktériumpázsitot készítünk.

Speciális NGM lemez RNS interferenciához:

Autoklávozás után a 60°C-ra hűlt standard NGM oldathoz a sók mellett hozzáadjuk a szelektivitást biztosító ampicillin (Amp) (50 µg/ml végkoncentráció) és tetraciklin (Tetr) (15 µg/ml végkoncentráció) antibiotikumokat, illetve az indukcióhoz szükséges IPTG-t (izopropil-β-D-tio-galaktózid) (0,4 mM végkoncentráció). Az RNSi lemezeken olyan speciális tetraciklin rezisztens HT115 *E. coli* törzseket használunk tápforrásként, melybe a csendesítéshez szükséges szekvenciát és az ampicillin rezisztencia gént tartalmazó L4440 (pPD129.36 plazmid – A. Fire, Stanford Egyetem) „feeding” vektort transzformáltuk. A HT115 baktériumok az IPTG hatására átírják a célgénre specifikus kettősszalú RNS szakaszt.

Speciális RNSi lemez élettartam mérésekhez (FUdR-os RNSi lemez):

A fent leírt két speciális NGM lemez ötvöze, mind a négy plusz komponenst (Amp, Tetr, IPTG és FUdR) tartalmazza a megfelelő végkoncentrációban.

5.2.2. Hímek előállítása

A vad-típusú és a legtöbb általunk használt mutáns fonalféreg populációban a hímek aránya 0,2%-nál kisebb. Mivel méréseinkhez nagyszámú hím állatra volt szükség, így hősokkot követő keresztezésekkel növeltük meg és tartottuk fenn a nagyobb hím arányt. 5-8 NGM lemezre kiraktunk lemezenként 4-5 db L4 hermafroditát, és hősokkoltuk őket 35-37°C-on 45-90 percen át, majd visszaraktuk az állatokat a kiindulási tartási hőmérsékletre (15-25°C). A hősokk következtében az F1 generációban jóval nagyobb %-ban jelennek meg hímek¹²⁷. Ezeket a hímeket a törzs hermafrodita tagjaival kereszteztük, így a következő generációban már közelítőleg 50% lett a hímek aránya.

5.2.3. Embrió preparálás

Törzsek tisztítására vagy szinkronizálására használt eljárás, melynek során egy lúgos oldatba (5M NaOH: hipó: víz = 1:2:2) rakjuk a lemosott állatokat. 8-10 perc kezelés után a mikrobiális fertőzések, valamint a lárvák és a felnőtt állatok elpusztulnak (szétmarja őket a lúg), és csak az embriók maradnak életben a peteburok védő hatása miatt¹²⁸.

5.3. *Drosophila* törzsek és fenntartásuk

A törzsek fenntartása és keresztezése 18-25°C-on történt. A kísérletek során 29°C-on voltak tartva az állatok, mert az UAS-Gal4 rendszer ezen a hőmérsékleten működik a leghatékonyabban. A hagyományos kukoricaliszt-élesztő-agar bázisú, szénhidrát tartalmú táptalajon tartottuk az állatokat üvegfiolákban, melyeket vattadugóval zártunk le. Mivel az állat nem fagyasztható le, a törzsek fenntartásához 18°C-on 2 hetente új, friss tápanyagot tartalmazó csőbe kellett átrázni néhány felnőtt egyedet.

Drosophila táptalaj összetétele: 66,85 g kukoricaliszt, 32,59 g cukor, 10 g agar, 26 g élesztő, 1 l hideg víz. Összekeverés után mikrohullámú sütőben 17-20 percig főztük (800 W) az elegyet, másfél-két percenként kevergetve (csomómentesítés). Ezután hűlni hagytuk, majd a kb. 60°C-os elegybe 10 ml 25%-os (m/V) nipagin (4-hidroximetil-benzoát) 96%-os etanollal alkotott oldatát adtuk hozzá. Az üvegfiolákba kb. 4-7 ml táptalajt mértünk szét.

5.4. *C. elegans* élettartam mérés

Az állatokat szinkronizálása általában az embriók összegyűjtésével történt (20-30 felnőtt hermafroditát hagytunk néhány órán át petézni az NGM lemezen.) Ez alól kivételt képeztek azok a vizsgálatok, melyekben *tra-1(e1488)* mutánsokat mértünk, mert ezek az állatok nem képesek lerakni az embriókat. Ebben az esetben lúgos embrió preparálással szinkronizáltuk a törzseket. Az utódok 20°C-on voltak tartva L4/fiatal felnőtt stádiumig, majd átkerültek FUDR-t tartalmazó NGM lemezre. Ezt az időpontot tekintjük az élettartam mérés 0. napjának. Ezzel az eljárással megakadályoztuk a generációk keveredését, a különböző mutánsokban esetlegesen eltérően működő csíravonal hatását, valamint a *tra-1(e1488)* mutánsok esetében az ún. „*bag of worms*” fenotípus kialakulását, ami az állatok korai pusztulását eredményezi. FUDR hiányában az állatokat 2 naponta átpakoltam új lemezekre, hogy megakadályozzam a generációk keveredését.

Az élettartam mérések nagy részét 25°C-on végeztem el, lemezenként 60-70 állattal. Egy mérést 20°C-on végeztem el, ez külön jelöltem. A hím-hermafrodita összehasonlító vizsgálatoknál 50-60 hermafrodita állat mellé 10-15 hímeket raktam. Naponta számoltam és távolítottam el az elpusztult állatokat. Azt az állatot tekintettem halottnak, amely a platinatűvel való finom érintés után sem mozdult meg és a garatja pumpáló mozgása is leállt.

Azokat az állatokat kizártam a mérésből melyek a petri csésze falára kimászva száradtak ki vagy valamilyen sérülés miatt pusztultak el. A mérést addig végeztem, amíg nem maradt élő állat a lemezen. A fertőzött lemezeket kizártam. RNS interferencia-kezelt állatok esetében az élettartam mérések pár pontban különböztek a fent leírtaktól. Az állatokat két generáción át neveltem RNSi lemezeken a mérés előtt, és csak 24-48 órát töltöttek RNSi/FuDR lemezen, majd átpakoltam friss RNSi lemezre. A FuDR csökkenti az RNSi hatékonyságát, és a 24-48 óra FuDR-os lemezen töltött idő elég az állatok sterilizálásához.

Az eredményekből SPSS 17 statisztikai program segítségével rajzoltam meg a Kaplan-Meier túlélési görbéket és számoltam ki az átlagos felnőtt élettartamot, valamint a p értékeket. Élettartam méréseknél elsősorban az átlagos, és nem a maximális élettartamot szokták figyelni, mivel a maximális élettartamot néhány kiugróan magas élettartamú állat jelentősen módosíthatja. A Kaplan-Meier túlélési görbék összehasonlításához tartozó p értékeket log rank (Mantel-Cox) teszttel, az átlagos élettartamokhoz tartozó p értékeket független két-mintás t -teszttel határoztam meg Bonferroni korrekciót alkalmazva. A szignifikanciát a következőképpen jeleztem: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. A használt statisztikai módszerek és a pontos adatok a F1 táblázatban vannak feltüntetve.

5.5. RNS interferencia (*C. elegans*)

RNS interferenciával (RNSi) lehet gének aktivitását hatékonyan „csendesíteni”. Lényege, hogy egy kettősszálú (ds) RNS molekula specifikusan gátolja a szekvencia-specifikus endogén mRNS működését. A *C. elegans* genetikában széleskörűen elterjedt az ún. „etetéses” RNSi módszer, mivel fonalférgekben a táplálkozás során a bélbe bekerült és felszívódott dsRNS az állat egész szervezetében szétterjed és minden sejtjében (szisztematikusan) „csendesíti” az adott gént. Ez alól csak az idegrendszer képez kivételt. Az „etetéses” RNSi során az L4440 („feeding”) (*Fire Lab, C. elegans Vector Kit*, 1999) vektorral transzformált *E. coli* HT115(DE3) baktérium törzzsel tápláltam az állatokat. Az L4440 vektorban egy Amp^r gén található, és a klónozó hely két oldalán ellentétes orientációban van egy-egy T7 promóter. A promóterek közé klónozott szekvenciáról így két darab egymással komplementer RNS szál íródik át, amelyek dsRNS-é állnak össze. A HT115 (DE3) törzsben egy Tn10 transzpozon ugrott az RNáz III enzimet kódoló *rcn14* génbe, ezért ezek a baktériumok nem képesek lebontani a dsRNS-t. A Tn10 transzpozon tartalmaz egy $Tetr^r$ gént, illetve egy IPTG-vel indukálható *lac* operátor/promóter által szabályozott T7 polimerázt. A kezelés során az IPTG

tartalmú RNSi lemezeket használtam, így az állatok táplálékául szolgáló baktériumok tartalmazták a megfelelő dsRNS-eket. A RNSi kísérletekben kontrollként üres L4440 vektort tartalmazó HT115 baktériumokat alkalmaztam. Az élettartam mérések során használt *daf-16(RNSi)*-t olyan genomi szakaszra lett tervezve, amely az összes *daf-16* izoformában megtalálható. FW primer: 5'-ATC AGG AAT CGT CAG CAA CC-3', RV primer: 5'-CGT GTG CTC AGA ATC CAC TT-3'. A *Western-blot* kísérlethez használt *tra-1ab(RNSi)* olyan szakaszra lett tervezve, mely mindkét izoformára specifikus. FW primer: 5'-AGG ATC CCG ATA CGG TTG TC-3', RV primer: 5'-TGG CAA CCG TAC TAC CAT TTG-3'⁴⁷.

5.6. Bioinformatikai módszerek

5.6.1. Konstrukciók tervezése

A DNASTAR (<http://www.dnastar.com/>) program segítette molekuláris munkámat, a konstrukciók és klónozások tervezését. A használt primereket a Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) programmal terveztem.

5.6.2. Konzervált GLI kötőhely keresése a humán *FoXO* gének genomi régiójába

Ezt az *in silico* elemzést Dr. Ortutay Csaba (Tamperei Egyetem, Finnország) végezte el. A részletes módszerleírás a²² cikkben olvasható.

5.7. Riporter konstrukciók készítése (*C. elegans*)

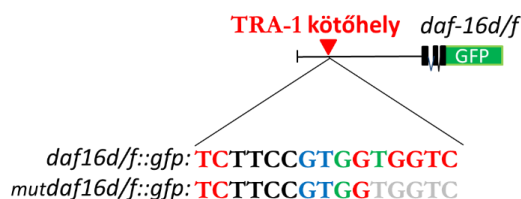
5.7.1. Rövid összefoglaló a riporter konstrukciókról

5.7.1.1. *daf-16::gfp(eluIs300)* konstrukció

A klónozni kívánt *daf-16* régiót *C. elegans*-ból izolált genomi DNS-ből szaporítottam fel PCR-rel. A PCR termék pPD95.75 (*Fire Lab C. elegans Vector Kit*, 1995) vektorba lett klónozva BamHI és PstI emésztés után. A pPD95.75 vektor tartalmazza a *gfp* riporter gént, a klónozott inszert pedig a *daf-16d/f* izoforma első három exonját és a TRA-1 kötőhelyet is magába foglaló kb. 4kb hosszú *upstream* szabályozó régiót (16. ábra). Felhasznált primerek: *daf-16d/f* FW: 5'-AAA ACT GCA GCC GCC AGC AGA TTT TAT TTG-3'; *daf-16d/f* RV: 5'-CGC GGA TCC CGC TCT TGT TGA TGG AGG TC-3'.

5.7.1.2. *mutdaf-16d/f::gfp(eluIs302)* konstrukció

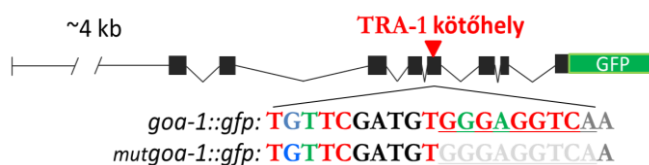
A vad-típusú TRA-1 kötőhelyet tartalmazó *daf-16d/f::gfp(eluIs300)* konstrukcióban *QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, #200516) segítségével rontottam el a feltételezett TRA-1 kötőhelyet (a kötés szempontjából fontos több bázis deléciója) a gyártó által megadott protokollt követve (16. ábra). Felhasznált primerek: *mutdaf-16d/f* FW: 5'-CTT GGC TCT TCC GTG GTT GCC AGT TGA CAG TT-3'; *mutdaf-16d/f* RV: 5'-AAC TGT CAA CRG VCA ACC ACG GAA GAG CCA AG-3'.



16. ábra. *daf-16d/f* riporter konstrukciók. A *daf-16d/f::gfp(eluIs300)* a *d/f* izoforma első három exonját tartalmazza, és az azt megelőző kb. 3 kb hosszúságú szabályozó régiót (ebben található az általunk meghatározott konzervált TRA-1 kötőhely). A *mutdaf-16d/f::gfp(eluIs301)* konstrukció abban különbözik az előző riporter konstrukciótól, hogy néhány, a kötés szempontjából fontos nukleotid hiányzik a kötőhelyből. Fekete négyszögek: exonok, közöttük lévő vonalak: intronok, piros háromszög: TRA-1 kötőhely. A szekvencia logóban a betűk színének jelentése: piros, a kötés szempontjából fontos nukleotidok, melyek megegyeznek a konszenzus kötőhellyel; zöld, olyan pozíció, melyben kétféle nukleotid is állhat; fekete, a kötés szempontjából lényegtelen nukleotidok; kék, eltérés a konszenzus szekvenciától; szürke, mutáns konstrukcióban hiányzó nukleotidok.

5.7.1.3. *goa-1::gfp(eluIs306)* és *mutgoa-1::gfp(eluIs307)* konstrukciók

Ezt a két konstrukciót Kutnyánszky Vera doktorandusz készítette el⁴².



17. ábra. *goa-1* riporter konstrukciók. A *goa-1::gfp(eluIs306)* tartalmazza a *goa-1* teljes kódoló szekvenciáját (benne a TRA-1 kötőhellyel) és 4 kb hosszúságú 5' szabályozó régiót. A *mutgoa-1::gfp(eluIs307)* abban különbözik az előzőtől riporter konstrukciótól, hogy néhány, a kötés szempontjából fontos nukleotid hiányzik a kötőhelyből. Fekete négyszögek, exonok; közöttük lévő vonalak, intronok; piros háromszög, TRA-1 kötőhely. A szekvencia logóban a betűk színének jelentése: piros, a kötés szempontjából fontos nukleotidok, melyek megegyeznek a konszenzus kötőhellyel; zöld, olyan pozíció, melyben kétféle nukleotid is állhat; fekete, a kötés szempontjából lényegtelen nukleotidok; kék, eltérés a konszenzus szekvenciától; szürke, mutáns konstrukcióban hiányzó nukleotidok.

A *goa-1::gfp(eluIs306)* konstrukció a teljes *goa-1* kódoló régiót és 4000 bp *upstream* szabályozó régiót tartalmaz, melyek a *gfp*-t tartalmazó pRH21 vektorba lettek klónozva (17. ábra). Primerek: *goa-1::gfp* FW: 5'-TTG GCG CGC CCT CGT CCA TAC TCA TTA CAG TTG C-3'; *goa-1::gfp* RV: 5'-ATT TGC GGC CGC CAA TAA TCA CAT CGG TGA CAG C-3'. Ezen konstrukcióból lett létrehozva a *mutgoa-1::gfp(eluIs307)* konstrukció *QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, #200516) segítségével. A *mutgoa-1::gfp(eluIs307)* konstrukcióban hiányzik kilenc, a kötés szempontjából fontos nukleotid a TRA-1 kötőhelyből (17. ábra). A mutagenézishez felhasznált primerek: *mutgoa-1::gfp* FW: 5'-GAA TAT TTA CAG ATT GTT CGA TGT AAG ATC AGA AAG GAA GAA GTGGAT-3', *mutgoa-1::gfp* RV: 5'-ATC CAC TTC TTC CTT TCT GAT CTT ACA TCG AAC AAT CTG TAA ATA TTC-3'.

5.7.2. Konstrukciók elkészítése során használt molekuláris biológia módszerek

5.7.2.1. Genomi DNS izolálása *C. elegans*-ból

A genomi DNS izolálását fenol/kloroform/izopropanol módszerrel végeztem el: 20 db tiszta, állatokat bőven tartalmazó kisméretű NGM lemezeiről M9 pufferrel mostam le az állatokat egy Falcon csőbe, majd centrifugáltam a szuszpenziót 1500 rpm-en 1 percig. A felülúszót eltávolítottam, és az állatokat két új eppendorf csőbe pipettáztam át (300 µl végtérfogat) és -70°C-on fagyasztottam le min. 15 percre. Felolvadás után csövenként 500 µl WLB-t (*worm lysis buffer*) és 3-5 µl Proteinase K-t (20 mg/ml) (Thermo Fisher Scientific, #EO0491) adtam az állatokhoz, majd 60-65°C-on 2-5 órán át inkubáltam az oldatot 20 percenként vortexelve. Ezután 30 µl 3M (pH 5,2) Na-acetátot és 500 µl fenolt adtam az elegyhez, óvatosan összekevertem, majd 14 000 rpm-en 4°C-on 5 percig centrifugáltam. A vizes fázisú felülúszót új eppendorf csőbe pipettáztam, hozzáadtam 500 µl fenol/kloroform/izopropanol elegyet, majd óvatosan összeráztam, és 14 000 rpm-en 5 percig centrifugáltam. Új eppendorf csőbe pipettáztam a vizes fázisú felülúszót, majd hozzáadtam 500 µl kloroformot, óvatosan összeráztam, majd 14 000 rpm-en 5 percig centrifugáltam. A vizes fázisú felülúszót új eppendorf csőbe pipettáztam, hozzáadtam 900 µl abs. etanolt, az oldatot 15 percig -70°C-on (vagy min. 1 órát -20°C-on) inkubáltam, majd 14 000 rpm-en 5 percig centrifugáltam. Az alkohol leszívása után a csapadékhoz hozzáadtam 400 µl 70%-os etanolt, és centrifugáltuk 14 000 rpm-en 3 percig, majd eltávolítottam a felülúszót, és kiszárítottam a csapadékot. Végül

30-100 µl DNáz-mentes vízben oldottam fel a csapadékot 5-10 percig 60°C-on inkubálva. Ezt követően 4°C-on tároltam a mintát a felhasználásig.

M9 puffer összetétele (1 l): 3 g KH₂PO₄; 6 g Na₂HPO₄; 5 g NaCl; 1 ml 1 M MgSO₄; 1 l biDW. Autoklávozással sterilizáltam az oldatot.

WLB-t (*worm lysis buffer*) összetétele: 20 mM Tris (pH 7,5); 50 mM EDTA; 200 mM NaCl; 0,5% SDS.

5.7.2.2. PCR

Templátként vad típusú *C. elegans*-ból izolált genomi DNS-t használtam. A PCR-hez *Fermentas High Fidelity PCR Enzyme Mix* (#K0191) kitet használtam a gyártó által ajánlott protokoll szerint.

Reakcióelegy:	Végső koncentráció
MQ	-
10x High Fidelity PCR Puffer MgCl ₂ -vel	1x
dNTP mix	0,2 mM
Primer FW	0,2 -1 µM
Primer RV	0,2 -1 µM
templát DNS	0,1-1 µg / 50 µl
High Fidelity PCR Enzyme Mix	1,25-2,5ul / 50 µl

PCR program (Termék < 3 kb)				PCR program (PCR termék > 3kb)			
	Hőmérséklet, °C	Idő (min: sec)	Ciklusszám		Hőmérséklet, °C	Idő (min)	Ciklus-szám
				Iniciáció	94	3	1
Iniciáció	94	3	1	Denaturáció	94	0:30	10
Denaturáció	94	0:30	35	Anelláció	Primer Ta	0:30	
	Primer anellációs hőmérséklete	0:30		Lánchosszabítás	68	1 min/kb	
Anelláció				Denaturáció	94	0:30	25
		1 min/kb		Anelláció	Primer anellációs hőmérséklete	0:30	
Lánchosszabítás	72			Lánchosszabítás	68	1 min/kb + 10 s / ciklus	
Végső lánchosszabítás	72	0:00	1	Végső lánchosszabítás	68	0:00	1

5.7.2.3. PCR termék izolálása agaróz gélből és az emésztések tisztítása

A PCR termékét gélből izoláltam. Az emésztéseket gélfuttatás után tisztítottam. Az izolálás és tisztítás a gyártó által megadott protokoll szerint történt a *QIAquick Gel Extraction Kit*-tel (QIAGEN, #28704). Protokoll: a kívánt DNS-t tartalmazó agaróz gél darabot steril zsilutpengével vágtam ki, majd Buffer QG oldatot adtam hozzá (100 mg gél: 300 µl Buffer QG arányban). Körülbelül 10 perc 50°C-on való inkubáció után (míg a gél teljesen fel nem oldódik) ellenőriztem az oldat színét: ha nem sárga, nátrium acetáttal állítottam be a megfelelő (5,0) pH-t. 100 mg gél: 100 µl izopropanol arányban izopropanolt adtam az oldathoz, amelyet QIAquick oszlopra pipettáztam át. 1 perc, 14 000 rpm-en való centrifugálás után az átfolyt felülúszót eltávolítottam, és 500 µl Buffer QG oldattal átmostam az oszlopot. 1 perc, 14 000 rpm-en való centrifugálás után az átfolyt felülúszót eltávolítottam, és 750 µl Buffer PE oldattal átmostam az oszlopot. 1 perc, 14 000 rpm-en való centrifugálás után az átfolyt felülúszót eltávolítottam, és ismét centrifugáltam 14 000 rpm-en 1 percig (szárítás). Steril eppendorfcsőbe helyeztem át az oszlopot, majd rámértem 30 µl MQ vizet, és centrifugáltam 14 000 rpm-en 1 percig.

5.7.2.4. Emésztés

A klónozás során a Thermo Fisher Scientific enzimeit használtuk, minden esetben a gyártó által ajánlott protokoll szerint.

5.7.2.5. Ligálás

A ligálás T4 DNS ligázzal (*Thermo Fisher Scientific*, #EL0016) történt a gyártó által ajánlott protokoll szerint. Reakcióelegy: linealizált vektor DNS (pPD95.75.) 20-100 ng; inszert (PCR termék) 5:1 arányban a vektorhoz képest; 2 µl 10x T4 DNS ligáz puffer; 1 µl T4 DNS ligáz; 20 µl végtérfogat. Protokoll: inkubáció 22°C-on, 10 percen át.

5.7.2.6. Kompetens sejt készítése

E. coli DH5 és HT115 sejteket a *Z competent kit* (Zymogen, #T3002) segítségével tettem kompetenssé a gyártó által ajánlott protokoll szerint. Protokoll: LB tápoldatban egy éjszakán

át növesztett friss *E. coli* kultúrából 0,5 ml-t átoltottam 50 ml SOB tápoldatba egy 500 ml-es tenyésztő flakában, és 150-250 rpm-en rázatva addig növesztettem a baktérium kultúrát, míg elérte az $OD_{600nm} = 0,4-0,6$ koncentrációt. Ezután a sejt kultúrát 10 percig jégen inkubáltam, majd centrifugáltam 4°C-on, 43000 rpm-en, 10 percig, eltávolítottam a felülúszót, és 5 ml jég hideg 1x *Wash Buffer*-ben óvatosan szuszpendáltam a sejteket. Megismételtam az előző lépést azzal a különbséggel, hogy 5 ml jég hideg 1x *Competent Buffer*-ben szuszpendáltam a sejteket, majd az oldatot steril eppendorf csövekbe jégen szétosztottam 0,2 ml-enként. A kész kompetens sejteket -70°C-on tároltam felhasználásig.

5.7.2.7. *E. coli* transzformálás

Az elkészített *E. coli* DH5 és HT115 kompetens sejteket a gyártó (Zymogen, #T3002) által ajánlott protokoll szerint transzformáltam, kisebb módosítással. Protokoll: a kompetens sejteket jégen olvasztottam ki, majd 5 µl ligátumot adtam hozzá, és 30 percig jégen inkubáltam, 5-10 percenként rázatva. Az elegyet 1 percig, 37°C-on hősokkoltam, majd 500 µl folyékony LB táptalajt adtam hozzá, és a sejteket 60 percig, 37°C-on rázatva növesztettem. A sejt kultúrát 1 percig, 5000 rpm-en centrifugáltam, leszívtam 500 µl felülúszót, majd a sejteket szuszpendáltam. A baktérium kultúrát előmelegített szelekciós lemezre szélesztettem (a DAF-16::GFP konstrukció esetén LB^{Amp}), és 37°C-on inkubáltam egy éjszakán át.

5.7.2.8. Plazmid DNS izolálása

A felszaporított plazmid DNS izolálását a baktériumsejtekből a *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System kit* (Promega, #A1330) segítségével végeztem el, a gyártó által ajánlott protokoll szerint. Protokoll: a sejteket megfelelő szelekciós markert tartalmazó folyékony LB táptalajban növesztettem egy éjszakán át 37°C-on, majd 1-10 ml sejtsuszpenziót centrifugáltam 14000 rpm-en 5 percig. A felülúszót eltávolítottam, és a csapadékot 250 µl *Cell Resuspend Solution*-ben szuszpendáltam. Az oldathoz 250 µl *Cell Lysis Solution*-t, majd 10 µl *Alkaline Protease Solution*-t adtam. Mindkét lépés után finoman összeráztam az elegyet, és a második rázás után 5 percig szobahőn inkubáltam. Ezután hozzáadtam 350 µl *Neutralization Solution*-t az oldathoz, finoman összeráztam, majd centrifugáltam 14000 rpm-en 10 percig. A felülúszót a kit-ben található szűrőoszlopra mértem, és centrifugáltam 14000 rpm-en 1 percig. Az átfolyt felülúszót eltávolítottam, majd

750 µl *Wash Solution*nel átmostam az oszlopot. 1 perc 14000 rpm-es centrifugálás után eltávolítottam az átfolyt felülúszót, és 750 µl *Wash Solution*nel újra átmostam az oszlopot. 1 perc 14000 rpm-es centrifugálás után eltávolítottam az átfolyt felülúszót, és ismét 1 percig 14000 rpm-en centrifugáltam az oszlopot. Az oszlopot áthelyeztem egy steril eppendor csőbe, rámértem 30 µl MQ vizet, és centrifugáltam 14000 rpm-en 1 percig.

5.7.2.9. Mutáns konstrukciók előállítása

A mutáns konstrukciókat *QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, # 200516) segítségével hoztam létre a gyártó által megadott protokoll szerint. Reakcióelegy: 5 µl 10× reakció puffer; X µl (10 ng) dsDNS templát (plazmid); X µl (125 ng) FW primer (a mutációt tartalmazza); X µl (125 ng) RV primer (a mutációt tartalmazza); 1 µl dNTPmix; 3 µl QuikSolution oldat; X µl biDW 50 µl végtérfogat; 1 µl PfuUltra HF DNS polimeráz (2.5 U/µl).

Program		
Hőmérséklet, °C	Idő (min)	Ciklusszá m
95	1	1
95	0:50	18
60	0:50	
68	1min/kb	
68	7	1

Végző lépésként DpnI-es emésztéssel megtisztítottam a terméket a templát DNS-től. A baktérium által szintetizált templát DNS Dam-metilált, míg a PCR-ben szintetizált mutáns DNS nem metilált. Így a metilált DNS-re specifikus DpnI enzim lebontja a templát DNS-t anélkül, hogy kárt okozna a mutáns DNS-ben. A kész konstrukciókat minden esetben először emésztéssel, majd egy cég által elvégzett szekvenálással ellenőriztem.

5.8. Transzgenikus *C. elegans* törzsek előállítása

A transzgenikus állatokat bioliztikus kotranszformációval (génpuska) hoztuk létre¹²⁹. A bevinni kívánt transzgént (GFP konstrukciók) tartalmazó plazmidot és a kotranszformációs markert [*unc-119(+)*] hordozó pRH21 plazmidot arany szemcsékre kötöttem, melyeket a PDS-1000/He rendszer (BioRad) segítségével *unc-119(ed3)* mutáns állatokba lőttem. Az *unc-*

119(ed3) állatok mozdulatlanok (Unc fenotípus), így ezen genetikai háttérben könnyen azonosítani lehet a menekítő *unc-119(+)* transzgént tartalmazó transzgénikus állatokat. A két transzgén nagy százalékban együtt kerül be az állatokba, de ezt ellenőriztem fluoreszcens mikroszkópia segítségével. A mozgó és zölden fluoreszkáló állatok mindkét transzgént tartalmazzák, míg a mozgó, de nem fluoreszkáló törzsek csak a pRH21 vektorra nézve transzgénikusak. A transzgének integrálódhatnak a genomba vagy extrakromoszómális elemként lehetnek jelen. Az integrált transzgén az állat minden sejtjében és minden utódjában megtalálható, míg az extrakromoszómális transzgén mozaikosan nyilvánul meg. Könnyen megkülönböztethető a kétféle típus, mivel az extrakromoszómális transzgénikus törzsben a menekítő *unc-119(+)* transzgén elvesztésére utaló Unc fenotípus jelenik meg. A *daf-16* és *goa-1* konstrukciók esetében is sikerült integrált transzgénikus törzseket létrehoznom.

5.9. Fluoreszcens mikroszkópia (*C. elegans*)

A vizsgálandó állatokat tárgylemezre cseppentett 2%-os agarpadra helyeztem levamizol tartalmú M9 cseppbe. Az alkalmazott 0,1 M végkoncentrációjú levamizol mozgásképtelenné teszi az állatokat. A 23. és 24. ábrák képeit Olympus-BX51 kutatómikroszkóppal, a 23. B ábra képeit Zeiss Axio Observer Mikroszkóppal, a 26A, 28 A és 29 ábrák képeit Zeiss AxioImager Z1 epifluoreszcens mikroszkóppal készítettem el. Az összehasonlított képek esetében a mikroszkóp beállításai minden esetben megegyeztek. A képek kvantitatív elemzését az *ImageJ* szoftver¹³⁰ segítségével végeztem el. A GFP jel intenzitás értékét állatonként úgy határoztam meg, hogy a körbe rajzolt teljes állat jelintenzitásából kivontam a háttér jelintenzitását. A relatív GFP jel intenzitását pedig úgy kaptam meg, hogy a kontroll esetében kapott átlagos GFP intenzitással visszaosztottam az adott kísérlet összes értékét. Az átlagos relatív GFP intenzitást legalább három független kísérlet eredménye alapján számoltam ki. Az SPSS 17 statisztikai program segítségével végeztem el a megfelelő statisztikai teszteket. A szignifikancia szintet a következőképpen jeleztem: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. A használt statisztikai módszerek és a pontos adatok az F5-F7 és F9-F10 táblázatban vannak feltüntetve.

5.10. Transzkript szintek meghatározása kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) és szemi-quantitatív PCR (szemi-q-PCR) segítségével (*C. elegans*)

A *daf-16* qRT-PCR mérésekhez minden esetben kb. 30 db L4/ fiatal felnőtt, illetve idős (6 napos) állatokból, a *goa-1* sq-PCR mérésekhez lúgos embrió preparálással nyert embriókból izoláltam teljes RNS tartalmat, amit ezután cDNS-sé írtam át, és ezzel végeztem el a kvantitatív és szemikvantitatív méréseket. Felnőtt állatok esetében tudtam válogatni a fenotípus alapján, így a minták 100%-a a megfelelő genotípusú és nemű egyedeket tartalmazta. Embriók esetében nem tudtam válogatni, így hímeikkel való keresztezésből (50% hím) származó, illetve a *him-5(e1490)* (30% hím) és *tra-1(e1099)/+* (~16,67% *tra-1* homozigóta pszeudohím) mutáns törzsekből származó embriók kevert populációk. Endogén referencia génként (belső kontrollként) az állandó expressziós szintet mutató *ama-1* és *pmp-3* (qRT-PCR), illetve *cdc-42* (sq-PCR) gént használtam¹³¹. Olvadási görbe elemzéssel megerősítettem a PCR-termék méretét és az aspecifikus sávok hiányát. A qRT-PCR eredmények értékelésekor a relatív génexpressziós értékeket a komparatív CT módszerrel a $2^{-\Delta\Delta CT}$ képlet segítségével határoztam meg¹³². sq-PCR esetében *ImageJ*-vel denzitometriai elemzést használva értékeltem ki az eredményeket, melynek értéke függ az expozíció idejétől, ezért a kapott értékek csak becslésnek tekinthetők, így statisztikai elemzésbe nem vonhatók. Az adatok az F4 és F8 táblázatban vannak feltüntetve. Felhasznált primerek: *pmp-3* FW 5'-GTT CCC GTG TTC ATC ACT CAT-3'; *pmp-3* RV 5'-ACA CCG TCG AGA AGC TGT AGA-3'; *daf-16d/f* FW 5'-CTC GTT CTC TCC GTA TTT CCA C-3'; *daf-16d/f* RV 5'-TGT CCA CAT TGC TCA TTG CT-3'; *cdc-42* FW 5'-CTT CGA CAA TTA CGC CGT CAC-3'; *cdc-42* RV 5'-CGA AAT TTC AGG CAC CCA TTT TTC-3'; *ama-1* FW 5'-GAA GGT CGC AGG TGG ATG-3'; *ama-1* RV 5'-GCA TGA TTT TTC GCT CCT G-3'; *goa-1* FW 5'-TGG TTC GGC TGA CAG AGA G-3'; *goa-1* RV 5'-CCG TTT CAT TGA ACT GAG CA-3'.

RNS izolálás *C. elegans*-ból

Az RNS izolálást a *ChargeSwitch Total RNA Cell Kit* (Invitrogen, #CS14010) segítségével végeztem el a gyártó által ajánlott protokoll szerint. Protokoll: az állatokat/embriókat 500 µl M9 pufferbe raktam és 1 percig 14000 rpm-mel centrifugáltam. A felülúszót leszívtam, majd 500 µl TRIzol® reagenst (*Molecular Research Center*, #TR118) adtam az elegyhez, és a mintákat háromszor lefagyasztottam (-80°C) és vortexelve felolvasztottam (szobahő). A

mintákat 5 perc szobahőn való inkubáció után 10 percig 4°C-on 14000 rpm-mel centrifugáltam. A felülúszót átpipettáztam egy új eppendorf csőbe, 200 µl kloroformmal kevertem össze, és 3 percig szobahőn inkubáltam. 15 perces 14000 rpm-es centrifugálást követően a felülúszót új eppendorba helyeztem, és ezt a lépést még egyszer megismételtem. Ezután 300 µl izopropanolt adtam a felülúszóhoz, és 10 percig szobahőn inkubáltam. 10 perc 14000 rpm-es 4°C-on való centrifugálást követően a felülúszót eltávolítottam, a csapadékot pedig átmostam 100 µl DEPC-es vízzel hígított 75%-os EtOH-lal. 5 perc, 14 000 rpm, 4°C-on történő centrifugálást követően a felülúszót eltávolítottam, és a csapadékot kiszáritottam szobahőn. Ezután a csapadékot 30 µl 60°C-os DEPC-es vízben feloldottam, és a mintákat - 80°C-on tároltam felhasználásig.

cDNS szintézis

Az izolált RNS-ből a cDNS szintézist a *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific, #K1622) segítségével végeztem el a gyártó által ajánlott protokoll szerint. Protokoll: 11 µl (0,1-5 µg) RNS-t és 1 µl random hexamer primert tartalmazó elegyet 5 percre 65°C-ra, majd jégre raktam, és hozzáadtam a következő komponenseket: 4 µl 5x Reakció puffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl); 2 µl 10mM dNTP mix; 1 µl RevertAid M-Mul V RT (200 U/µl). A 20 µl végtérfogatú elegyet 5 percig 25°C-on, majd 60 percig 42°C-on, végül 5 percig 70°C-on inkubáltam.

qRT-PCR protokoll

A reakciót 20 µl-es végtérfogatban végeztem el a *LightCycler Carousel Detection System* (Roche) LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, 3 003 230) Kittel a gyártó protokollja szerint. Reakcióelegy: 10 µl LightCycler FastStart Reaction Mix SYBR Green; 4 µl primer mix (2 µl FW+2 µl RV); 1 µl MQ; 5 µl DNS templát (cDNS). Az amplifikációt LightCycler 480 System (Roche) készülékkel hajtottam végre az alábbi reakciókörülmények mellett:

Program		
Hőmérséklet, °C	Idő (sec)	Ciklusszám
95	600	1
95	10	45
58	10	
72	20	
95	4	1
65	15	1
65→95	0,1°C/sec	1
95	1	1

A duplaszálú DNS mennyiségével arányos a SYBRGreen festék fluoreszcencia intenzitása, ezt minden ciklus végén 72°C-on méri a készülék. Olvadási görbe analízissel ellenőriztem, hogy csak egyetlen specifikus termék képződött a reakcióban.

Szemi-kvantitatív-PCR protokoll

Reakcióelegy: 1,5 µl DreamTaq Green DNS polimeráz puffer (Thermo Fisher Scientific, B71); 1,87 µl FW primer (5 µM); 1,87 µl RV primer (5 µM); 0,3 µl dNTP (10 mM); 0,15 µl DreamTaq Green DNS polimeráz (5 U/µL) (Thermo Fisher Scientific, EP0711); 7,31 µl MQ; 2 µl DNS templát (50 ng/µl -es cDNS minták).

Program		
Hőmérséklet, °C	Idő (sec)	Ciklus-szám
95	120	1
95	30	33
58	30	
72	90	
72	300	1

A mintákat 2%-os agaróz gélen futtattam SB pufferben.

5.11.Kromatin immunoprecipitáció (ChIP) *C. elegans*-on

A ChIP analízist a ¹³³ referencia alapján végeztem el kisebb módosításokkal. A kontroll és ChIP mintákban a specifikus DNS mennyiségét qRT-PCR (SYBR Green (LightCycler 480, Roche) segítségével kvantifikáltam lokusz specifikus primereket használva. A TRA-1

kötőhelyet tartalmazó *xol-1* gént használtuk pozitív kontrollként.⁴⁸ A TRA-1 kötőhelyet nem tartalmazó *daf-11* gént használtam belső negatív kontrollként a kvantifikálás normalizálásánál. A primerek szekvenciáját a BiSearch software-rel terveztem meg¹³⁴. Használt statisztikai módszer és adatok az F3 táblázat vannak feltüntetve. Felhasznált antitestek: anti-TRA-1 (Santa Cruz Biotechnology, cN-21, cs-15660, #B2008, kecske); anti-TRA-1 (Vellailab - laborunkban létrehozott, nyúl); anti-IgG (egér, ChIP kit, Millipore). Felhasznált primerek: *xol-1* (pozitív kontroll) FW 5'-GAA TAC CCC TGT AAG ACC ACA CA-3'; *xol-1* (pozitív kontroll) RV 50-AGG ACG CAG ACA CGT TAG AAT AG-3'; *daf-11* (negatív kontroll) FW 5'-CCT TAA TCC CTG CAC ACG TT-3'; *daf-11* (negatív kontroll) RV 5'-CCG AGC AAA AAC AAT GAT GA-3'; *daf-16d/f* FW 5'-CAA GCC TCA AAC ACC AGT GA-3'; *daf-16d/f* RV 5'-CTG TCAA CTG GCA AGA CCA C-3'

ChIP

Vegyes korú vad-típusú állatokat gyűjtöttem össze és őröltem porrá folyékony N₂-ben steril dörzsmozsárral, majd *cross-linking buffer*be (1% formaldehid PBS-ben) raktam a mintákat, és 15 percig szobahőn inkubáltam. A reakció leállításához ezután glicint adtam 0,125 M végkoncentrációban. 5 percig 4°C-on 17000 g centrifugáltam a mintákat, majd a csapadékot átmostam négyszer PBS-el, és feloldottam *Nuclear Lysis Buffer Mix*-ben (5 mM PIPES, pH 8; 85 mM KCl; 0,5% NP40; proteináz inhibitor [*Complete cocktail tablets*, Roche]), majd 15 percig 4°C-on inkubáltam, miközben 20-30 msp-ig vortexeltem 2 percenként. 10 perces 21 000 g-s 4°C-os centrifugálást követően a csapadékot *Sonicating Buffer*-ben (1% SDS; 10 mM EDTA; 50 mM TrisHCl, pH 8.1; proteináz inhibitor [*Complete cocktail tablets*, Roche]) oldottam fel. A keresztkötött DNS-t szonikálással (maximális erő, jégen, 9 db 30 s-os ciklus) körülbelül 500 bp hosszú darabokra tördeltem, aminek hatékonyságát gélelektroforézissel ellenőriztem. 5 perc, 17 000 g, 4°C centrifugálást követően a felülúszót új eppendorfba mértem át. Az antitestek hozzáadása előtt a minta térfogatának 10%-át félretettem („kontroll” minta). Minden IP reakcióhoz 15-15 µl protein A and G mágnesgyöngyöt (Life Technologies) mostam *IP buffer : sonicating buffer* (9:1) oldatában (IP puffer: 0,01% SDS; 1,1% Triton X-100; 1,2 mM EDTA; 16,7 mM Tris-HCl, pH 8); 167 mM NaCl, proteináz inhibitor [*Complete cocktail tablets*, Roche]). Minden IP reakcióhoz 1 µg antitestet adtam a gyöngyökhöz. 4°C-os, 2 órás inkubációt követően 500 µl oldott kromatint (*IP buffer : sonicating buffer* [9:1]-ban) és DTT-t (1 M) adtam a reakcióhoz. 4°C-on folyamatos forgatás mellett inkubáltam a mintákat

egy éjszakán át, majd a gyöngyöket buffer A-ban (0.1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl, pH 8,1; 0.15 M NaCl; proteinase inhibitor [*Complete cocktail tablets*, Roche]), buffer B-ben (0.1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl pH 8.1; 0.5 M NaCl proteinase inhibitor [*Complete cocktail tablets*, Roche]), buffer C-ben (0,25 M LiCl; 1% NP40; 1% Na-deoxycholate; 1 mM EDTA; Tris-HCl pH 8,1; proteinase inhibitor [*Complete cocktail tablets*, Roche]) és TE buffer-ben (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA pH 8,0) mostam. 5 perc, 4°C-os inkubációt követően 4000 g-vel centrifugáltam a mintákat, majd a csapadékot 200 μ l *elution buffer*-ben (0,1 M NaHCO₃; 1% SDS) oldottam fel, és a felülúszót új eppendorfba mértem át. A mintákat 65°C-on inkubáltam 5 M NaCl-ban és 0,5 M EDTA-ban, majd 1 μ l RNázA (10 mg/ml) hozzáadása után 37°C-on 1 órát inkubáltam. 4 μ l EDTA, 8 μ l TRIS-HCl (1M, pH 7) és 0,5 μ l proteinase K-t (20 mg/ml, Roche) adtam az oldathoz, majd 45°C-on 2 órát inkubáltam. A DNS tisztítása a *High Pure PCR Template Preparation Kit*-el (Roche, #11796828001) történt, majd vízben oldottam fel a DNS-t. A félretett kontroll mintát (genomi DNS) kezeltem RNaseA-val, Proteinase K-val, EDTA-val és Tris-HCl-vel (1M, pH 7), majd melegítettem és utána tisztítottam.

ChIP-et követő qRT-PCR

A PCR reakciót 20 μ l-es végtérfogatban végeztem el a *LightCycler Carousel Detection System* (Roche) LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) kittel a gyártó protokollja szerint. Reakcióelegy: 5 μ l tisztított DNS; 5 μ l primer mix (500 nM FW és 500 nM RV); 10 μ l SYBR Green I PCR Master Mix.

Program		
Hőmérséklet, °C	Idő (sec)	Ciklusszám
95	600	1
95	10	45
60	10	
72	20	
95	300	1

5.12. Hatóanyag-kezelések *D. melanogaster*-ben

Az AUTEN-67 és AUTEN-99 kismolekulákat DMSO-ban (Sigma, #D8418) oldottuk fel, majd élesztőszuszpenzióhoz (2 g szárított élesztő, 10 ml víz, forralva) adtuk hozzá 100, ill. 200 μ M-os végkoncentrációban. Kontroll állatok esetében a kezeltekével megegyező térfogatú DMSO-t kevertünk az élesztőszuszpenzióhoz. A szuszpenziókból nagyobb adagot készítettünk, melyeket 1 ml-enként szétosztottuk és -20°C -on lefagyasztva tároltuk a kísérlet végéig. A hatóanyagcsöveket a hagyományosan használt *Drosophila* táptalaj felszínén 65 μ l AUTEN-t, illetve csak DMSO-t tartalmazó élesztő szuszpenziót szétosztva készítettük el, melyeket ezután állni hagyunk egy napig. Ilyen csövekbe kerültek a kezelt felnőtt egyedek a bábból való kikelésüket követően 0-14 órával. Az állatokat minden második nap új, frissen készült hatóanyagcsövekbe ráztuk át. A kísérletek során az állatok 29°C -on voltak tartva.

5.13. Western blot analízis (*C. elegans* és *D. melanogaster*)

C. elegans törzsek esetében 200-200 db fiatal felnőtt állatból, míg *D. melanogaster* esetén párhuzamosonként 7 db felnőtt állat fejéből izoláltuk fehérjét. A mintákat SDS-PAGE-n futtattam meg, és nitrocellulóz membránra vittem fel. A megfelelő antitestekkel való inkubáció után NBT-BCIP oldattal (Sigma, #72091) történt az előhívás. Elsődleges ellenanyagok: anti-TRA-1 (nyúl, 1:1000, általunk létrehozott) és anti-alpha-Tub84B (egér, 1:2500, Sigma, #T6199); anti-Ref(2)P (nyúl, 1:2500¹³⁵), anti-Atg8a (nyúl, 1:2500¹³⁶). Másodlagos ellenanyagok: anti-nyúl IgG alkáli foszfatáz (1:1000, Sigma, #A3687) és anti-egér IgG alkáli foszfatáz (1:1000, Sigma, #A8438). A kapott eredményeket *ImageJ*-ben értékeltem ki, denzitometriai elemzést használva, melynek értéke függ az előhívás és az expozíció idejétől, ezért a kapott értékek csak becslésnek tekinthetők, így statisztikai elemzésbe nem vonhatók be. Az adatok az F2, F11 és F12 táblázatokban vannak feltüntetve.

Fehérje izolálás

C. elegans: 200 állatot raktam 200 μ l M9-be és 1 percig 2000 rpm-en centrifugáltam. A felülúszót leszívtam 50 μ l-ig és háromszor lefagyasztottam folyékony N_2 -ben, majd felolvasztottam. Hozzáadtam 12,5 μ l 5xSB puffert és 2 percig közepes erősségen szonikáltam. A mintákat 5 perces 95°C -os inkubációt követően felhasználtam vagy -20°C -on tároltam.

D. melanogaster: mintánként 7 db 21 napos felnőtt *Drosophila* fejét raktunk mintánként 28,6 µl Fly lysis bufferbe, majd 28,6 µl 2x SDS mintafelvívőt adtunk hozzájuk. 5 percig 95°C-on forraltuk a mintákat, majd homogenizálást követően újabb 5 percig forraltuk 95°C-on. 5 perces 8000 g-s centrifugálást követően a felülúszót új eppendorf csövekbe mértük át. Az elkészült mintákat -20°C-on tároltuk felhasználásig.

Western blot

A fehérje mintákat 5 perc forralással denaturáltam, majd azonos térfogatú (20 µl) mintákat vittem fel gélre (mini-PROTEAN TGX *precast gels*, 4-20%, Biorad, #456-1093). A fehérjék futtatása után a nedves blottolás nitrocellulóz membránra (KiskerBiotech, #30805150) történt. Ezután TBST-vel (*tris-buffered saline* + Tween-20) átmostam a nitrocellulóz membránt, majd egy órát blokkoltam 3% tejpor tartalmú (Biorad, #170-6404) TBST-ben. A megfelelő elsődleges ellenanyagot 3% tejpor tartalmú TBST oldatban adtam a mintákhoz, és 4°C-on egy éjszakán át inkubáltam. Ezt követően 3x 10 percen át mostam TBST-ben, majd a megfelelő, alkalikus foszfátáz-konjugált másodlagos ellenanyaggal inkubáltam 3% tejpor tartalmú (Biorad, #170-6404) TBST-ben 1 órán át. Háromszor 10 perces TBST mosást követően alkalikus foszfátáz (AP) pufferrel mostam át a mintákat 2x 5 percen át. Az előhívás NBT-BCIP (Sigma, 72091) kemilumineszcens AP szubsztráttal történt. *ImageJ* program segítségével értékeltem ki az eredményeket denzitometriai elemzést használva. A kapott számértékek nagyban függenek az előhívás idejétől és az expozíciós időtől, így csak becslésnek tekinthetők.

Felhasznált oldatok

2x SDS mintafelvívő oldat: 0,757 g Tris bázis (Sigma, #T1503-KG); 2,3 g SDS (BioRAD, #1610302); 11,5 ml 87% glicerin; 40 ml-ig feltölteni biDW-zel, pH 6,8 beállítás HCl/NaOH-dal.

Fly lysis buffer: 1% Tween20; 50mM Tris pH 7,5; 150mM NaCl; 1mM EDTA, biDW 1 proteináz inhibitor tabletta [cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail, Sigma, #11836153001]).

10x fehérje futtató (*running*) puffer: 30,3 g Tris bázis (Sigma, #T1503-KG); 144 g glicin (VWR, #97061-128); 5 g SDS (Sigma, #L-4390) 1 l biDW. Az elektroforézishez 1x-re hígítva használva (pH 8,8, háromszor használható).

10x transzfer puffer: 30,3 g Tris bázis (Sigma, # 1503-KG); 144 g glicin (VWR, #97061-128); 1 l biDW. A nedves blottoláskor metanol és 1x transzfer puffer 1:8 arányú oldatát használtam (sorrend: kétszer desztillált víz + metanol + 10x transzfer puffer) (4°C-on tároltam, háromszor használható).

10x TBS: 15,175 g Tris bázis (Sigma, #1503-KG); 45g NaCl; 0,5 l biDW (pH 7,5).

1xTBST: 100 ml 10xTBS; 900 ml biDW; 1ml Tween20.

3% tejpor 1xTBST: 1,5 g tejpor; 50 ml 1x TBST.

AP (alkalikus foszfatáz) puffer: 10 ml 1M Tris-HCl (pH 9,5) [1 ml 6N HCl + 8 ml 1N HCl]; 5 ml 1M MgCl₂; 2 ml 5M NaCl; 100 µl 20% Tween 20; 100 ml-ig feltölteni biDW-vel.

Előhívó oldat: 5,88 ml AP puffer 120 µl NBT-BCIP oldattal (Sigma, #72091).

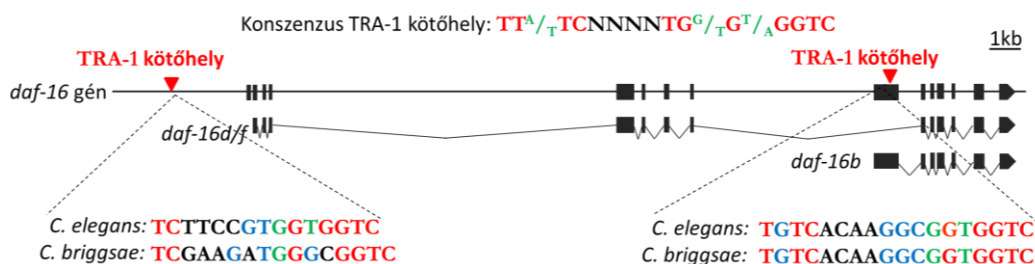
6. Eredmények és értelmezésük

6.1. Az élettartam ivarspecifikus szabályozása *C. elegans*-ban

6.1.1. TRA-1 kötőhelyek a *daf-16* genomi régióban

A kutatócsoportunk által azonosított 42 potenciális TRA-1 célgén⁴⁸ között szerepel a *daf-16* is, melyben két potenciális TRA-1 kötőhelyet találtunk (18. ábra). Az egyik a *d/f* izoformáktól 2,9 kb távolságra van 5' irányban, a másik a *b* izoforma első exonjában található, mely a többi izoformában introni régió. Egy másik *Caenorhabditis* faj ortológ génjében is megtalálhatók nagyon hasonló TRA-1 kötőhely-szerű szekvenciák, mely evolúciós konzerváltságra utal (18. ábra).

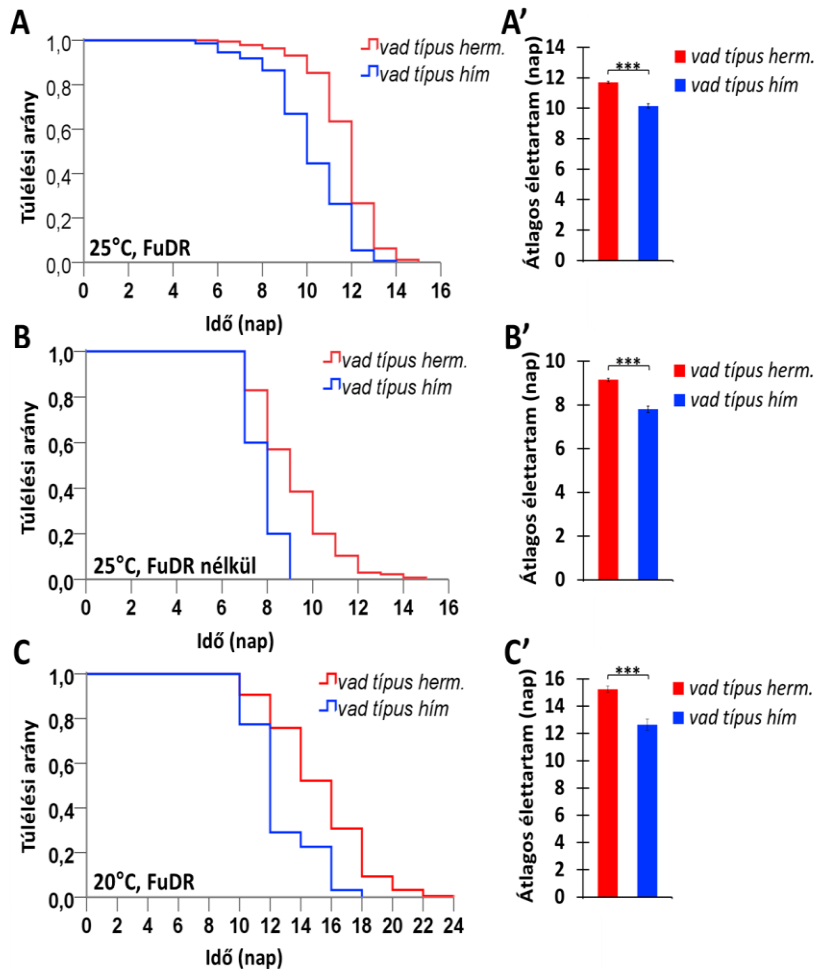
Kutatásunk során mindkét TRA-1 kötőhely funkcionalitását megvizsgáltuk. A *d/f* izoformának jelentős szerepét írták le az élettartam szabályozásában⁸¹, ezért az 5' irányba elhelyezkedő kötőhely és ezen izoforma esetében az élettartam szabályozásában betöltött ivarspecifikus funkciójára koncentráltunk. A *b* izoformának a dauer lárva fejlődésében van szerepe⁸¹, így az exoni régióban elhelyezkedő kötőhely esetén ezt a folyamatot vizsgáltuk. Az utóbbi elemzés eredményei a kapcsolódó cikkben²² és Kosztelnik Mónika doktori disszertációjában kerülnek kifejtésre.



18. ábra. TRA-1 kötőhelyek a *daf-16* gén genomi környezetében. Ábra felső része: a konszenzus TRA-1 kötőszekvencia. Középső rész: konzervált TRA-1 kötőhelyek találhatók a *daf-16* leghosszabb izoformáitól (*d/f*) kb. 2,9 kb távolságra *upstream* és a *b* izoforma első exonjában (piros háromszög). Az utóbbi a többi izoforma introni régiójának felel meg. Alsó rész: *C. elegans*-ban talált kötőhelyek szekvenciája és a *C. briggsae* ortológ genomi környezetében talált kötőhelyek szekvenciája. Fekete négyszögek: exonok; közöttük lévő vonalak: introni régiók; piros háromszög: konzervált TRA-1 kötőhely. Szekvenciák színei: piros: erősen konzervált, a kötés szempontjából fontos nukleotidok; zöld: kevésbé konzervált nukleotidok; fekete: a kötés kialakulásához nem esszenciális nukleotidok; kék: eltérés a konszenzus szekvenciától; N: bármelyik nukleotid.

6.1.2. Hermafrodita túlsúllyal rendelkező populációkban a hermafroditák tovább élnek a hímeknél

Meglepő módon nincs konszenzus arról, hogy *C. elegans*-ban melyik ivar él tovább. Csoportosan tartva az állatokat a hermafroditák, míg magányos tartás esetén a hímek élettartama a nagyobb^{19,20}. Ezek az anomáliák a kísérletes rendszerek sajátosságaiból (pl. erősen mesterséges körülmények) fakadhatnak^{19–21,23,24}.



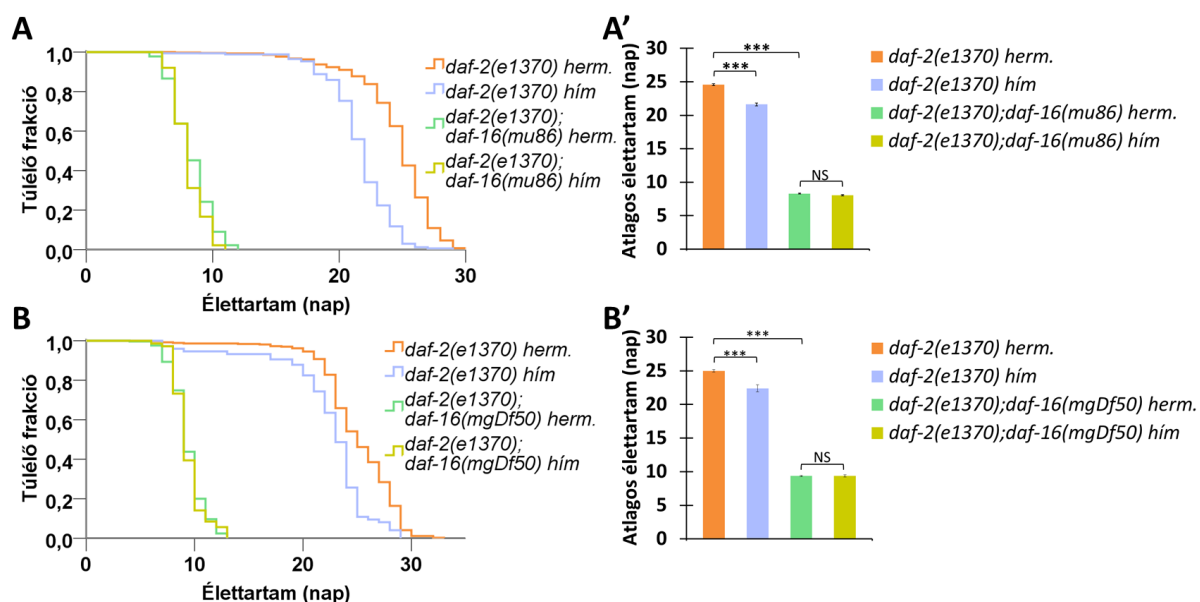
19. ábra. Hermafrodita túlsúllyal rendelkező vad-típusú populációkban a hermafroditák tovább élnek a hímeknél. (A-C) Kaplan-Meier élettartam görbék; (A'-C') átlagos élettartam diagrammok, melyeken az átlag \pm SEM értékek vannak ábrázolva. Adatok és pontos statisztika a függelék F1 táblázatában. FUdR: 5-fluoro-2-dezoxiuridin; herm.: hermafrodita; ***: $p < 0,005$.

Vad-típusú *C. elegans* populációkban a hímek aránya alacsony a hermafroditákhoz képest^{1,137}. A mérések során a nagy hermafrodita többlettel rendelkező vegyes populációkat modelleztem.

Ezek a körülmények állhatnak véleményünk szerint legközelebb a vad populációkra jellemző körülményekhez és biztosíthatják a legtermészetesebb egyedi és szociális viselkedési-élettani mintázatokat.

Eredményeink alapján a magas hermafrodita aránnyal (>80%) rendelkező vegyes populációkban a hermafroditák tovább élnek, mint a hímek (19. ábra A'-A''). Mivel a hőmérséklet és a FUDR is hatással lehet az élettartamra¹³⁸, mérésünket megismételtük FUDR nélkül, illetve alacsonyabb hőmérsékleten (20°C) is, és mindig azonos eredményt kaptuk (19. ábra B-C').

6.1.3. Insulin/IGF-1 jelátvitel defektív mutánsokban a hermafroditák hosszabb élettartama DAF-16/FoXO-függő



20. ábra. *daf-2(e1370)* mutáns genetikai háttérben a hermafroditák megnövelt élettartama DAF-16-függő. Funkcióvesztéses *daf-2(e1370)* mutánsokban megfigyelhető a hermafroditák hímeknél hosszabb élettartama magas hermafrodita aránnyal rendelkező vegyes populációkban. Ez a nemi különbség eltűnik *daf-16(lf)* funkcióvesztéses mutáns genetikai hátterekben, és mindkét nem azonos élettartamú. (A-A') *daf-16(mu86)* mutánsok élettartama; (B-B') *daf-16(mgDf50)* mutánsok élettartama. (A, B) Kaplan-Meier élettartam görbék; (A', B') átlagos élettartamok, melyeken az átlag \pm SEM értékek vannak ábrázolva. Adatok és pontos statisztika az F1 táblázatban. herm: hermafrodita; ***: $p < 0,005$; NS: nem szignifikáns.

Az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal fontos szerepet játszik a *C. elegans* élettartamának meghatározásában⁵². Az útvonal effektor transzkripciós faktora a DAF-16, amely a sejtmagba

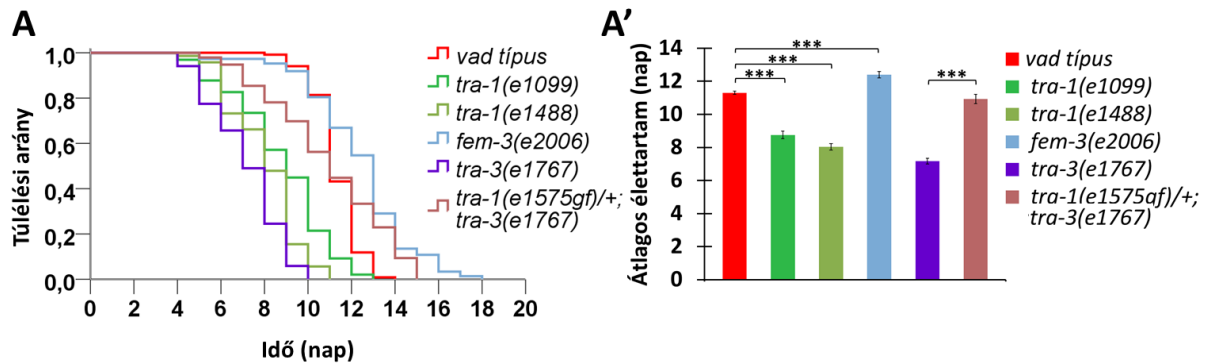
kerülve fejti ki élettartam növelő hatását. Vad-típusú jól táplált állatokban az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal receptora a DAF-2 olyan kaszkádot indít be, mely normálisan gátolja a DAF-16 magi lokalizációját (csupán egy alacsony bazális aktivitás marad meg)⁵². Emiatt a DAF-16 funkciójában bekövetkező változások könnyebben vizsgálhatók *daf-2(lf)* mutáns genetikai háttérben, ahol az útvonal gátló hatása nem érvényesül.

Funkcióvesztéses *daf-2(e1370)* mutáns genetikai háttérben, a vad-típushoz hasonlóan a hermafroditák éltek tovább a hermafrodita túlsúllyal rendelkező vegyes populációkban (20. ábra). A nemek közötti élettartam különbségeket a *daf-16(lf)* funkcióvesztéses mutáns allélok (*mu86* és *mgDf50*) szuppresszálják (20. ábra). Ebben az érzékenyített genetikai háttérben a magasabb DAF-16 aktivitás okozhatja a hermafroditák hímekhez képest megnövekedett élettartamát.

6.1.4. A TRA-1 hat a hermafroditák élettartamára

Hipotézisünk szerint a nemek élettartama a szex-determinációs génkaszkád szabályozása alatt áll. Ennek igazolására megvizsgáltam, hogy a TRA-1 aktivitás milyen hatással van az állatok élettartamára. Az XX (hermafrodita) kariotípusú állatok a *tra-1(e1099)* funkcióvesztéses mutáció hatására hímmé, a *tra-1(e1488)* funkciócsökkenéses mutáció hatására interszexszé (pszeudohím: a test nagy része hím) alakulnak. Mindkét mutáció hatására jelentősen csökkent az állatok élethossza a vad-típushoz képest (21. ábra). A *tra-1(e1575gf)* funkciónyeréses és *fem-3(e2006)* funkciócsökkenéses mutációk hatására az XX (hermafrodita) és XO (hím) kariotípusú állatok is nőtényként fejlődnek. A FEM-3 a szomatikus szex-determinációs útvonalban a TRA-1 funkcióját gátolja (4. ábra), így a *fem-3(lf)* funkcióvesztéses mutánsok *tra-1* funkciónyeréses mutánsnak tekinthetők. A *fem-3(e2006)* egy termoszenzitív mutáció, 15°C-on az állatok vad fenotípusúak, így a törzs könnyen fenttartható, 25°C-on viszont minden állat önmegtermékenyítésre képtelen (csak petesejteket termelő) nőtényként fejlődik. *tra-1(e1575gf)* heterozigóta XX és XO kariotípusú állatok is önmegtermékenyítésre képtelen nőtényként fejlődnek, így ez a mutáció csak úgy tartható fenn, ha a nőtények hímekkel párosodnak. Ezt az allélt egy *tra-1(e1575gf)/+; tra-3(e1767)* genotípusú törzs formájában tarjuk fenn. Ebben a törzsben a *tra-1(e1575gf)/+* (XX és XO) állatok nőtények, míg a *tra-1(e1575gf)* mutációval nem rendelkezők a *tra-3(e1767)* hatása miatt hímek (XO) vagy pszeudohímek (XX). A *tra-1(e1575gf)* homozigóta mutánsok életképtelenek. Az 21. ábrán jól

látható, hogy a *fem-3(e2006)* mutánsok szignifikánsan tovább élnek a vad típusnál. A *tra-1(e1575gf)/+; tra-3(e1767)* genotípusú állatok a kontrollhoz [*tra-3(e1767)*] képest mutattak szignifikáns élettartam növekedést (21. ábra). Eredményeim alapján a fonalféreg szex-determinációs útvonal szabályozza az élettartamot, és a TRA-1 pozitívan hat az élettartamra.



21. ábra. A TRA-1 aktivitása növeli az élettartamot. *tra-1(e1099)* funkcióvesztéses és *tra-1(e1488)* funkciócsökkenéses mutánsok élettartama kisebb a vad-típusnál. *fem-3(e2006)* funkcióvesztéses mutáns (mely megfelel egy funkciónyeréses a *tra-1* mutánsnak) és a *tra-1(e1575gf)* funkciónyeréses mutáns állatok megnövekedett élettartamúak. A *tra-3(e1767)* funkcióvesztéses mutáció szükséges a *tra-1(e1575gf)* mutáns törzs fenttartásához. (A) Kaplan-Meier élethossz görbék; (A') a megfelelő átlagos élettartam diagrammok, melyeken átlag \pm SEM értékek vannak ábrázolva. Adatok és a pontos statisztika az F1 táblázatban található meg. ***: $p < 0,005$.

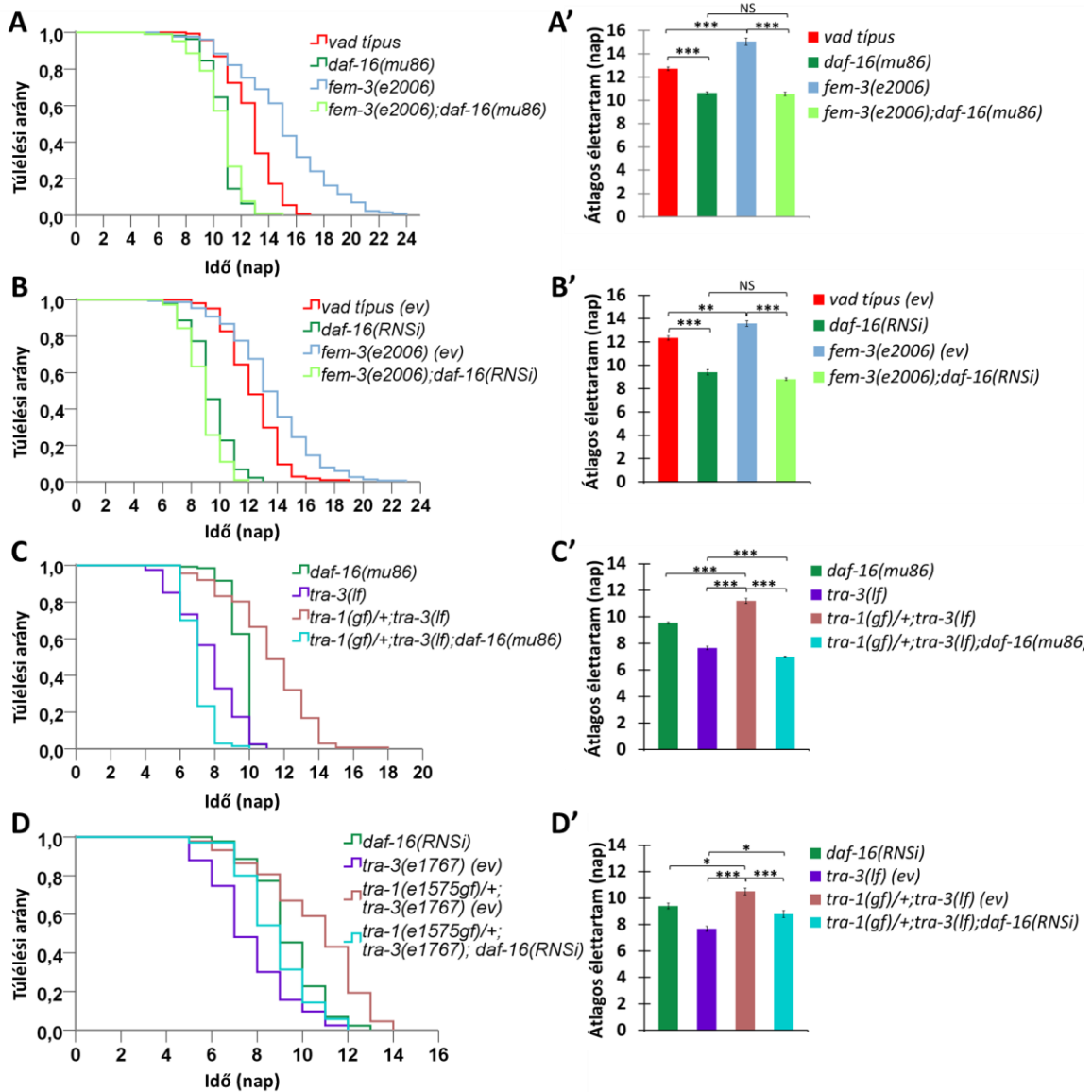
6.1.5. A TRA-1 élettartam növelő hatása DAF-16-függő

Hipotézisünk szerint a TRA-1 a *daf-16* működésén keresztül hat az öregedési folyamatra. Ezért megvizsgáltuk, hogy a TRA-1 hiperaktív állatok megnövekedett élettartama kifejeződik-e *daf-16(lf)* mutáns genetikai háttérben. A *daf-16(mu86)* funkcióvesztéses mutáció (22. ábra A és C) és a *daf-16* RNSi kezelés (22. ábra B és D) egyaránt szuppresszálta a *fem-3(e2006)* és *tra-1(e1575gf)* mutánsok megnövekedett élettartamát, ami alátámasztotta hipotézisünket.

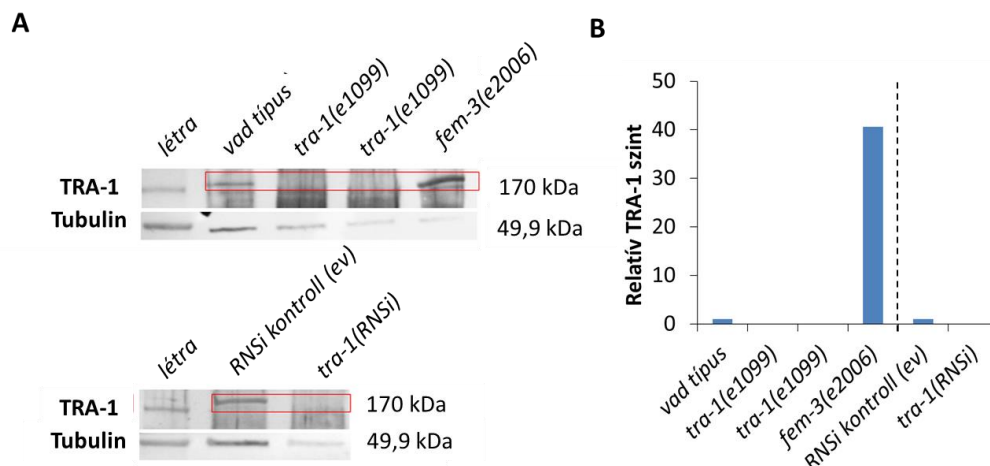
6.1.6. A TRA-1 *in vivo* köt a *daf-16* szabályozó régiójában talált konzervált kötőhelyhez

ChIP (*chromatin immunoprecipitation assay*) kísérlettel megvizsgáltam, hogy *in vivo* képes-e közvetlenül kötni a TRA-1 transzkripció faktor a *daf* izoformától 5' irányba található konzervált kötőhelyhez. A kísérletben egy általunk készített és egy kereskedelmi forgalomban

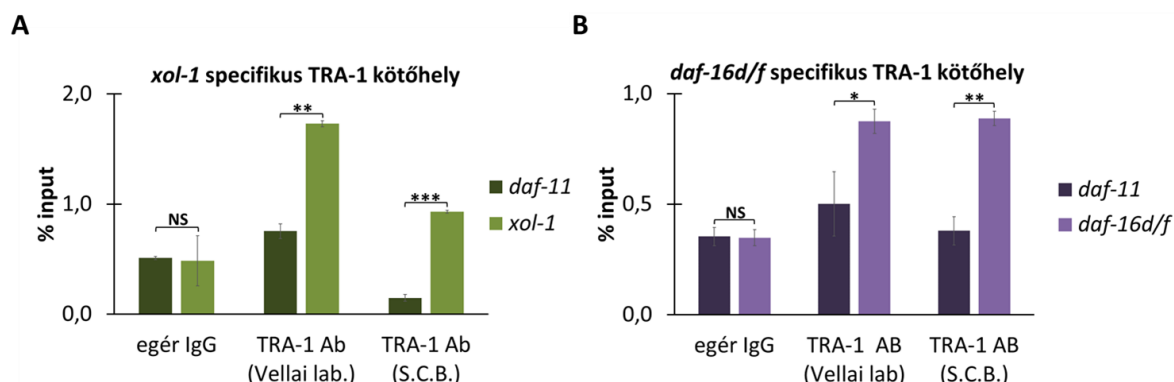
kapható (Santa Cruz Biotechnology) TRA-1-specifikus antitestet használtunk. A ChIP kísérlet előtt *Western blot* analízissel igazoltam, hogy az általunk készített antitest jelöli a TRA-1A fehérjét. Az antitest vad-típusban jelölte a TRA-1A fehérjét a várt mérettartományban³⁹, míg *tra-1(lf)* mutáns, ill. *tra-1(RNSi)* állatokban ez a jellegzetes csík nem volt jelen a nitrocellulóz membránon (23. ábra). *fem-3(e2006)* mutánsokban, melyekben a TRA-1A fehérje nem bomlik le proteolitikusan, nagyobb mennyiségű TRA-1 fehérjét mutattam ki (23. ábra).



22. ábra. A TRA-1 élettartam növelő hatása DAF-16-függő. *daf-16(lf)* mutáció (A-C') és *daf-16* RNSi kezelés (B-D') egyaránt szuppresszálja a *fem-3(e2006)* (*tra-1* hiperaktív) funkcióvesztéses, ill. a *tra-1(e1575gf)* funkciónyeréses mutánsok megnövekedett élettartamát. (A-D) Kaplan-Meier élettartam görbék; (A'-D') átlagos élettartam diagrammok, melyeken az átlag \pm SEM értékek vannak ábrázolva. Adatok és pontos statisztika az F1 táblázatban (függelék). herm: hermafrodita; "ev": „empty vector” (üres RNSi vektor) *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,005; NS: nem szignifikáns.



23. ábra. Az általunk készített TRA-1 antitest jelöli az endogén TRA-1 fehérjét. A TRA-1A fehérje (175kDa³⁹) relatív felhalmozódását vizsgáltam *Western blot* analízissel, mely során az általunk készített TRA-1 ellen termeltetett antitestet használtam. *tra-1(lf)* mutáns genetikai háttérben [*tra-1(e1099)*], valamint *tra-1* RNSi hatására eltűnik a TRA-1 mérettartományában levő csík, míg *fem-3(e2006)* mutáns háttérben felhalmozódik a fehérje. **(A)** *Western blot* kép. A TRA-1-specifikus sávot kerettel emeltem ki. **(B)** TRA-1 fehérje relatív mennyisége kvantitatív elemzés után. A szaggatott vonal két oldalán lévő értékek nem összevethetőek. α -Tubulin használtam a belső kontrollként. Létra: fehérje molekulatömeg létra. A pontos adatok az F2 táblázatban (függelék) vannak feltüntetve.

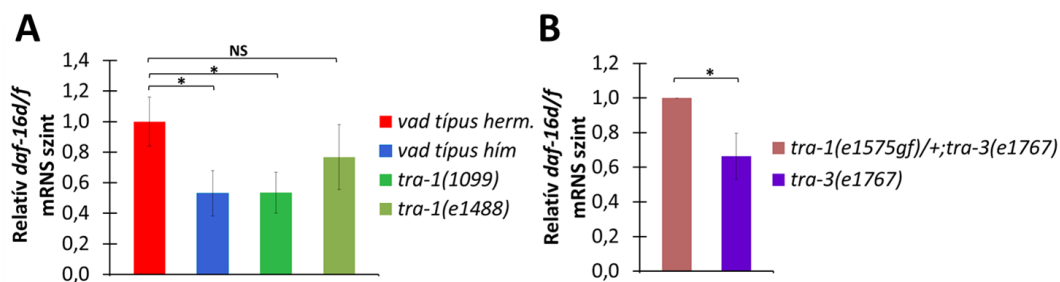


24. ábra. A TRA-1 *in vivo* köt a DAF-16 szabályozó régiójában talált konzervált kötőhelyhez. **(A, B)** A ChIP kísérlet alapján a TRA-1 képes *in vivo* kötni a TRA-1 kötőhelyet tartalmazó *xol-1* genomi fragmenthez (pozitív kontroll) és a *daf-16* genomi régiójában talált kötőhelyet tartalmazó DNS szakaszhoz, míg a *daf-11* genomi régiójához (belső negatív kontroll) nem köt. “Vellai lab”: az általunk készített TRA-1 antitestet jelöli, S.C.B: Santa Cruz Biotechnology cég kereskedelemben kapható TRA-1 antitestét jelöli; Ab: antitest (*antibody*); egér IgG: negatív kontroll. A diagrammokon az átlag \pm SEM értékek vannak ábrázolva. Adatok és a pontos statisztika az F3 táblázatban (függelék) megtalálható; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,005$; NS: nem szignifikáns.

A ChIP vizsgálat során a TRA-1 egyik ismert célgénjét, a *xol-1*-t használtam pozitív kontrollként, *daf-11a*-t pedig negatív kontrollként. Eger IgG-vel vizsgáltam az aspecifikus kötődéseket. Mindkét általunk használt TRA-1-et jelölő antitest specifikusan és hasonló hatékonysággal kötődött a *daf-16* szabályozó régiójában talált kötőhelyhez, mint a *xol-1* génben található kötőhelyhez (24. ábra). Az eredmény arra utal, hogy a TRA-1 fehérje képes *in vivo* közvetlenül kötődni a konzervált kötőhelyhez, így közvetlenül szabályozhatja a *daf-16* transzkripcióját.

6.1.7. Hermafroditákban a TRA-1 közvetlenül serkenti a *daf-16d/f* izoforma expresszióját

Hipotézisünk szerint a hermafrodita és hím állatok élettartamában megfigyelhető különbségek hátterében az eltérő DAF-16D/F aktivitás (*daf-16d/f* expresszió) állhat, melyet a TRA-1 szabályozása alakít ki a hermafroditákban. Kvantitatív *real-time* PCR segítségével határoztam meg a *daf-16d/f* izoformák relatív transzkript mennyiségét a két nemben. A *daf-16d/f* transzkriptum szintje jóval magasabb volt hermafroditákban, mint hímekben (25. ábra A és B). A TRA-1 hermafroditákban aktív, hímekben inaktív. Ez az összefüggés azt feltételezi, hogy a TRA-1 aktiválja a *daf-16d/f* izoformák expresszióját.



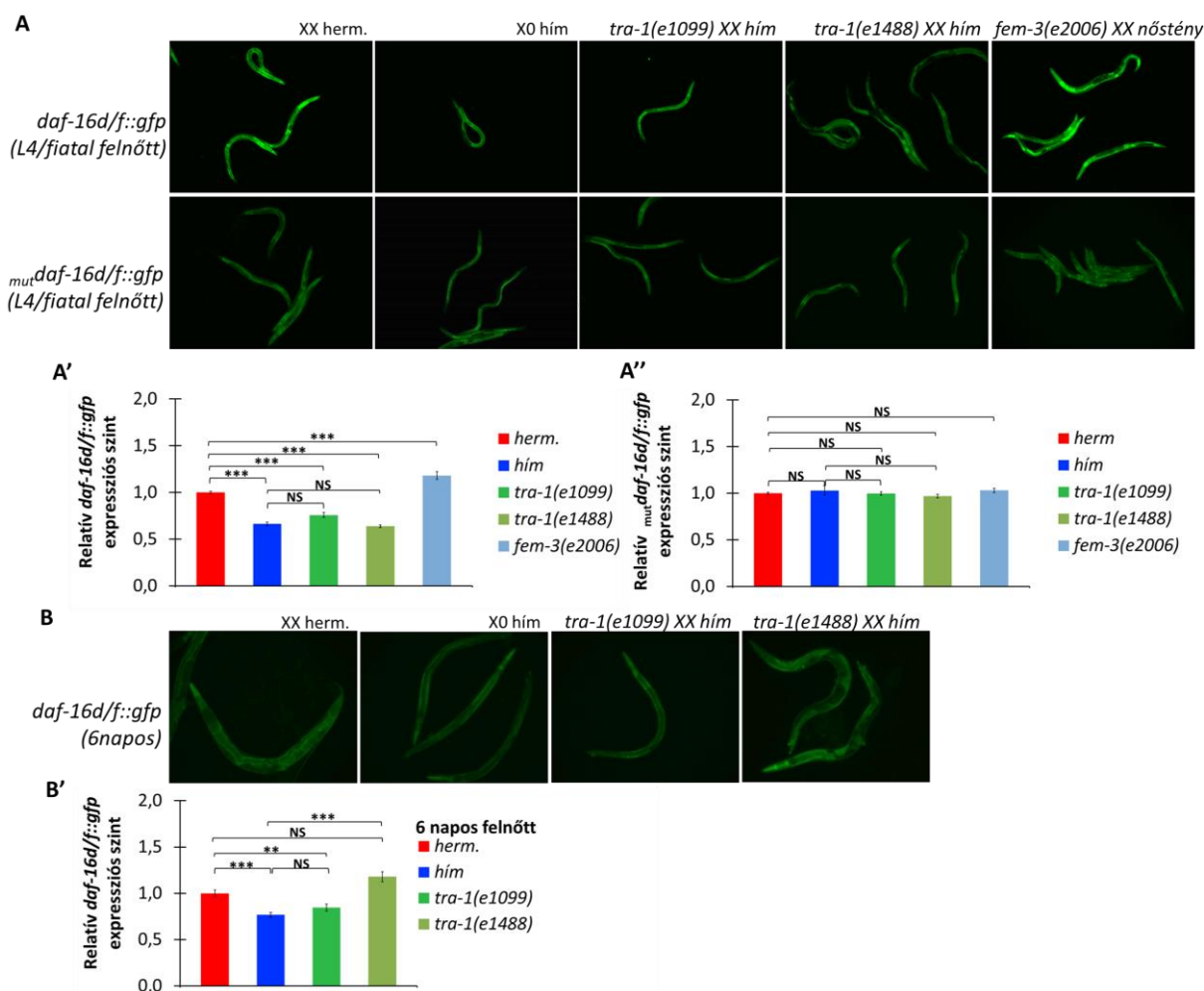
25. ábra. A TRA-1 fehérje serkenti a *daf-16d/f* izoforma transzkripcióját. (A) qRT-PCR analízis során a *daf-16d/f* transzkriptum relatív mennyisége szignifikánsan magasabb volt hermafroditákban, mint hímekben, valamint lecsökkent *tra-1(lf* és *rf)* mutáns genetikai háttérben a kontrollhoz képest. (B) Ezzel összehagban a transzkriptum mennyisége megnőtt *tra-1(gf)* mutáns állatokban. A vizsgálatok fiatal felnőtt állatokban történtek. A *pmp-3* gént használtuk belső kontrollként. A grafikonokon az átlag látható szórással. Adatok és pontos statisztika az F4 táblázatban (függelék) található meg. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; NS: nem szignifikáns.

Valóban, *tra-1* funkcióvesztéses mutánsokban szignifikánsan csökkent, míg *tra-1* funkciócsökkenéses mutánsokban mérsékelten csökkent a *daf-16d/f* transzkriptumok szintje (25. ábra A). Ezekkel az eredményekkel összhangban *tra-1(gf)* funkciónyeréses mutánsokban megnőtt a *daf-16d/f* transzkriptum mennyisége a kontrollhoz képest (25. ábra B). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a TRA-1 fehérje serkenti a *daf-16d/f* izoforma transzkripcióját. A ChIP kísérlet eredményei alapján ez a hatás közvetlen lehet.

6.1.8. A TRA-1 a talált kötőhelyen át serkenti a *daf-16d/f* expresszióját

A *daf-16* lokuszon található konzervált TRA-1 kötőhelyek funkcionalitásának vizsgálatára létrehoztam egy a kötőhelyeket is magába foglaló izoforma specifikus *daf-16* riporter konstrukciót [*daf-16d/f::gfp (eluIs300)*] tartalmazó transzgénikus törzset (16. ábra). Noha L4 stádiumú lárvákban és fiatal felnőtt állatokban a *daf-16d/f::gfp (eluIs300)* mindkét nemben kifejeződik a test jelentős részében, hermafroditákban szignifikánsan magasabb volt az expresszió szintje mint hímekben (26. ábra A-A'). *tra-1(e1099)* funkcióvesztéses és *tra-1(e1488)* funkciócsökkenéses genetikai háttérben csökkent, míg *fem-3(e2006)* funkcióvesztéses mutáns háttérben (*tra-1* funkciónyerésnek felel meg) megnőtt a *daf-16d/f* expresszió (26. ábra A-A'). Ez az expressziós különbség idősebb állatokban is megmaradt (26. ábra B-B'). Ezek az eredmények egybevágóak a qPCR analízis során nyert adatokkal, és alátámasztják, hogy a TRA-1 serkenti a *daf-16 d/f* izoforma expresszióját.

Elkészítettem a riporter konstrukció TRA-1 kötőhelyre mutáns változatát is [*mutdaf-16d/f::gfp (eluIs301)*], melyből öt – a kötés szempontjából létfontosságú – nukleotid hiányzik (16. ábra). Ennek a konstrukciónak az expressziós szintje azonos volt a két nemben és *tra-1* funkcióvesztéses és funkciónyeréses (*fem-3* mutáns) genetikai hátterekben (26. ábra A és A''). A transzgénikus törzsekkel végzett expressziós elemzés alapján arra következtethetünk, hogy a TRA-1 fehérje a konzervált kötőhelyen keresztül serkenti a *daf-16d/f* izoforma expresszióját hermafroditákban.



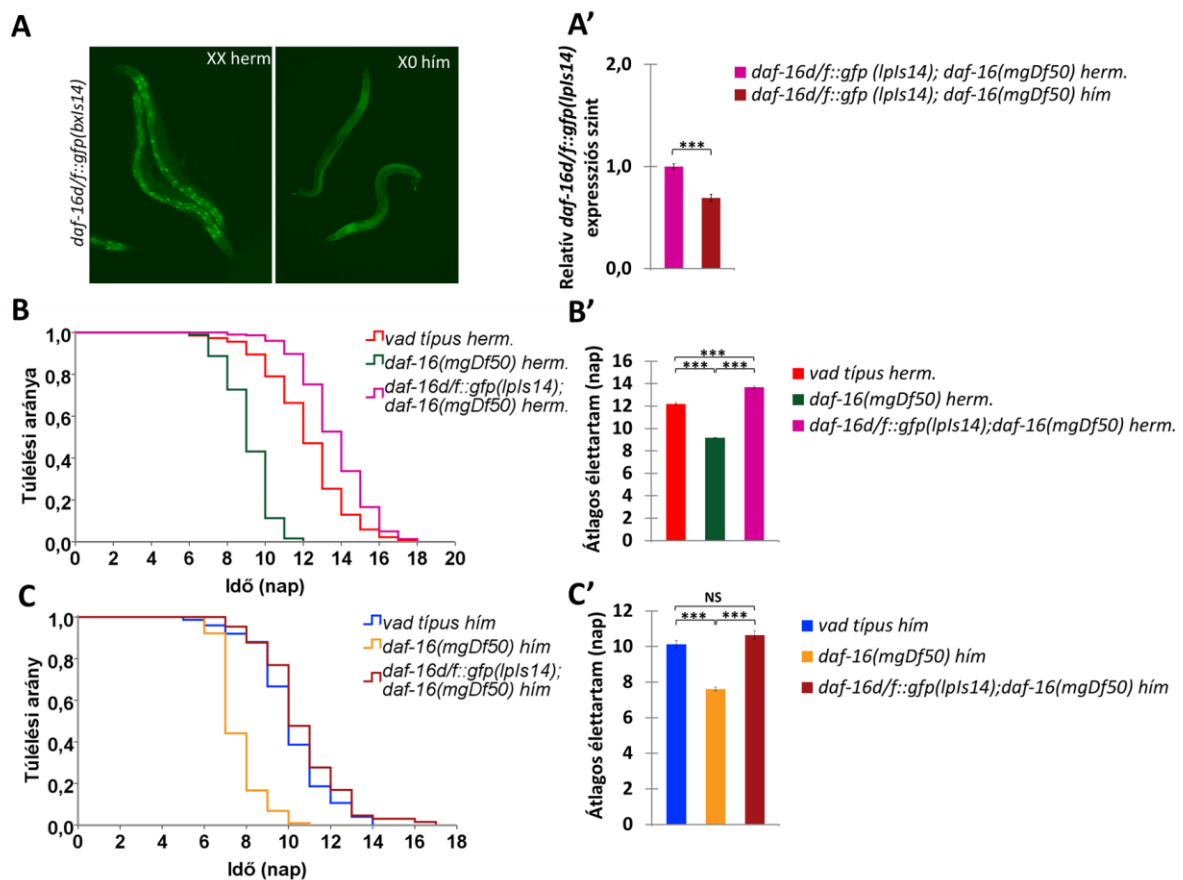
26. ábra. A TRA-1 fehérje a konzervált kötőhelyen át serkenti a *daf-16d/f* izoforma expresszióját. A *daf-16d/f::gfp* (*eluIs300*) konstrukció expressziója csökken hímekben és *tra-1(lf és rf)* mutáns genetiaki háttérben, de megnő *fem-3(lf)* mutáns háttérben a megfelelő kontrollokhoz képest. Ezzel szemben a *mut daf-16d/f::gfp* (*eluIs301*) konstrukció (melyben nincs meg a konzervált kötőhely) expressziós szintje azonos volt a két nemből és a különböző mutáns háttérben. (A-A'') L4 lárvák/ fiatal felnőtt állatok, (B-B') 6 napos felnőtt állatok fluoreszcens képe. (A', A'' és B') relatív expressziós intenzitás a két nemből és mutáns háttérben. A diagrammokon az átlag \pm SEM értékek vannak ábrázolva. Az összehasonlított fluoreszcens mikroszkópos képek azonos expozíciós idővel és nagyítással készültek. Adatok és a statisztika az F5 táblázatban (függelék) található meg. herm.: hermafrodita; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$; NS: nem szignifikáns.

6.1.9. Egy funkcionális *daf-16d/f* riporter transzgén jobban kifejeződik hermafroditákban és nagyobb mértékben növeli az élettartamot, mint hímekben

Az általam készített *daf-16d/f::gfp* (*eluIs300*) konstrukció csak expressziós vizsgálatokra használható, funkcionális vizsgálatokra nem alkalmas, mivel a *d/f* izoformának csak az első három exonját tartalmazza (transzkripciós fúziós riporter). Ezért egy olyan integrált,

funkcionális transzlációs fúziós *daf-16d/f::gfp* (*lpIs14*) transzgénikus törzset⁸¹ is bevontam vizsgálatokba, amely tartalmazza az általam vizsgált konzervált TRA-1 kötőhelyet. *daf-16(mgDf50)* funkcióvesztéses mutáns genetikai háttérben elemeztem a transzgén expresszióját, hogy a többi *daf-16* izoforma esetleges hatását kizárhassam. A *daf-16(mgDf50)* mutáns allél egy 20 kilobázis hosszú deléciót tartalmaz, mely minden *daf-16* izoformát érint.

Az *lpIs14* transzgén expressziós elemzése alátámasztotta az *eluIS300*-as transzgénnel kapott eredményünket, mely szerint a hermafroditákban nagyobb mennyiségben termelődik a *daf16d/f* izoforma, mint hímekben (27. ábra A-A'). A sejtmagba lokalizált DAF-16D/F::GFP mennyisége is nagyobb hermafroditákban, mint hímekben (27. ábra A).

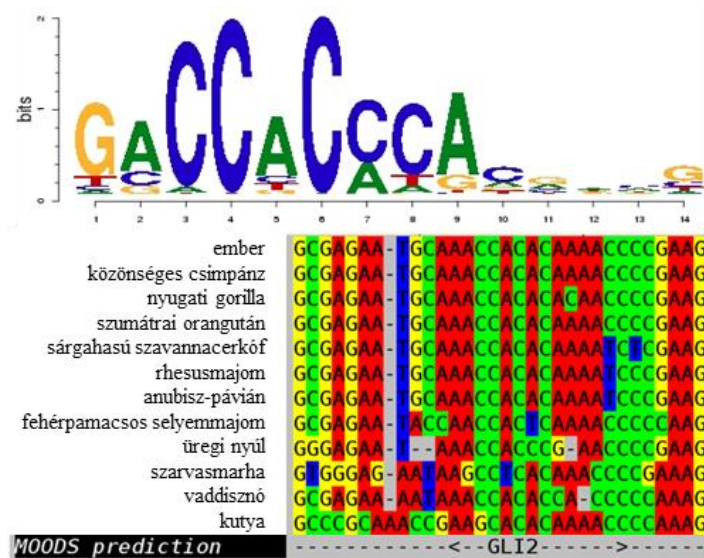


27. ábra. Egy funkcionális *daf-16d/f* transzgén (*lpIS14*) jobban megnöveli az élettartamot hermafroditákban, mint hímekben. (A-A') Az *lpIS14* transzgén expressziója magasabb hermafroditákban, mint hímekben. (B-C') Míg hímekben (az endogén *d/f* szinthez képest) enyhén túltermelődő *lpIS14* transzgén éppen csak menekíti *daf-16(lf)* mutáns háttérben a vad-típusú élettartamot, addig hermafroditákban további élettartam növekedést eredményez a vad-típushoz képes. (B, C) Kaplan-Meier élettartam görbék. (B', C') Átlagos élettartam diagrammok, melyeken az átlagos \pm SEM értékek vannak feltüntetve. Adatok és a statisztika az F1 és F5 táblázatokban található meg. herm.: hermafrodita; ***: $p < 0,005$; NS: nem szignifikáns.

Megvizsgáltam a transzgén élettartamra gyakorolt hatását nagy hermafrodita túlsúllyal rendelkező vegyes populációkban is. A hermafroditákban (az endogén *d/f* szinthez képest) enyhén túltermelődő transzgén⁸¹ nemcsak menekítette a *daf-16(lf)* mutánsok rövidebb élettartamát, de moderáltan megnyújtotta azt a vad-típushoz képest (27. ábra B-B'). Ezzel szemben hímekben a transzgén csak a vad-típusú élettartam menekítésére volt elegendő (27. ábra C-C'). Az *lpIS14*-es transzgénnel végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a *daf-16d/f* izoforma nagyobb mennyiségben termelődik hermafroditákban, mint hímekben. Ez a különbség hermafroditákban nagyobb átlagos élettartamhoz vezetett.

6.1.10. Egy konzervált GII kötőhely a human *FoXO3* génben

Kíváncsiak voltunk arra, hogy az általam feltárt TRA-1 – *daf-16* szabályozási kapcsolat konzervált-e. Ezért *in silico* analízist végeztünk és konzervált GLI kötőhelyet kerestünk a humán *FoXO* gének genomi régiójában. Emlősökben négy *FoXO* gén található (*FoXO1*, 3, 4 és 6), melyek közül a *FoXO3*-at hozták összefüggésbe az öregedéssel¹³⁹. A *FoXO4* főemlős specifikus, ezért kizártuk az elemzésből. Az analízis során konzervált GLI kötőhelyet találtunk a *FoXO3* gén első intronjában, mely erős konzerváltságot mutatott az emlősök között (28. ábra).

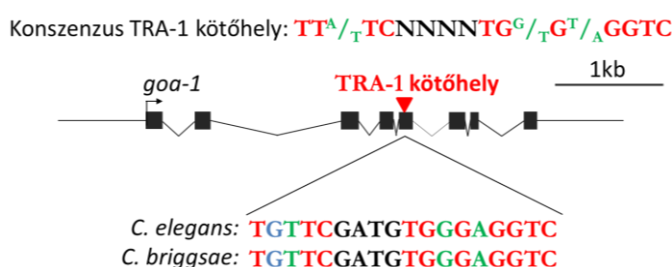


28. ábra. Konzervált GLI kötőhely emlősök *FoXO3* génjének első intronjában Ábra felső része: konszenzus GLI kötőszekvencia logója. Ábra alsó része: a vizsgált emlősfajokban a *FoXO3* gén első intronjában GLI kötőszekvenciát találtunk, mely erős konzerváltságot mutatott. (Hotzi és mtsai., 2018, módosítva²²)

6.2. Idegrendszeri funkciók ivarspecifikus szabályozása *C. elegans*-ban

6.2.1. Konzervált TRA-1 kötőhely a *goa-1* génben

Kutatócsoportunk által azonosított 42 potenciális célgén közül egy másik potenciális találatot a *goa-1* képviselt⁴⁸. A *C. briggsae* ortológ *goa-1* génjében is megtalálható a konzervált TRA-1 kötőszekvencia, mely a kötőhely konzerváltságára utal. *C. elegans*-ban a TRA-1 kötőhely a *goa-1* gén 5. exonjában található meg (29. ábra). Ez a pozíció szokatlannak tűnhet (kódoló régió), de mára már ismertté vált, hogy kódoló szekvenciák transzkripció faktor kötőhelyeként is szolgálhatnak prokariótákban és eukariótákban egyaránt¹⁴⁰.



29. ábra. Konzervált TRA-1 kötőhely a *goa-1* gén 5. exonjában. Felső rész: a konszenzus TRA-1 kötőszekvencia. Középső rész: potenciális TRA-1 kötőhely a *goa-1* gén 5. exonjában. Alsó rész: *C. elegans*-ban talált kötőhelyek szekvenciája és a *C. briggsae* ortológ genomi környezetében talált kötőhelyek szekvenciája hasonló. Fekete négyzetek: exonok; a köztük lévő vonalak: introni régiók; piros háromszög: konzervált TRA-1 kötőhely. Szekvenciák színei: piros, erősen konzervált (a kötés szempontjából fontos nukleotidok); zöld: kevésbé konzervált nukleotidok; fekete: a kötés kialakulásához nem esszenciális nukleotidok; kék: eltérés a konszenzus szekvenciától; N: bármilyen nukleotid.

6.2.2. A TRA-1 közvetlenül gátolja a *goa-1* transzkripcióját felnőtt hermafroditákban

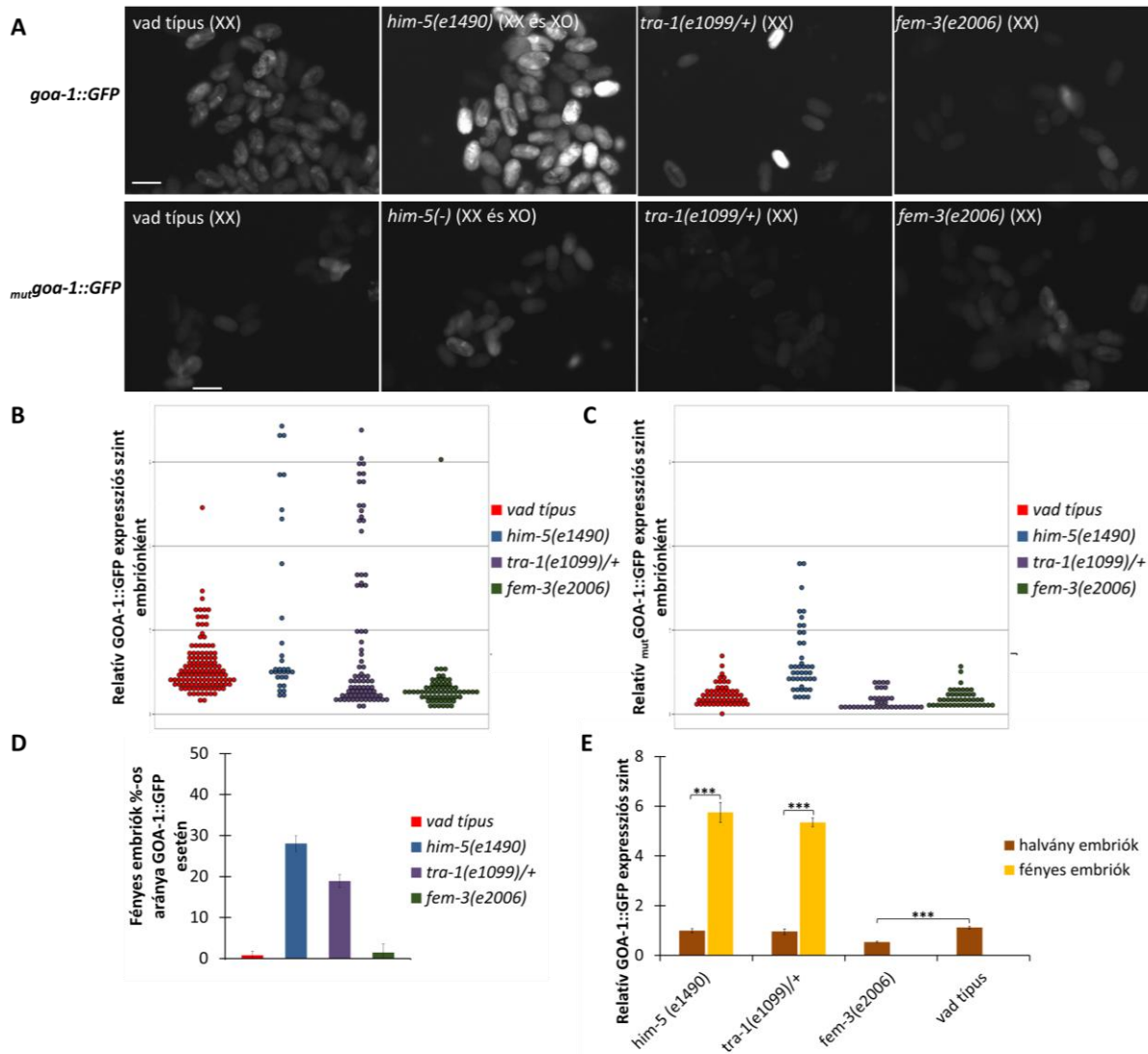
Ebben az alfejezetben azokat az eredményeinket foglalom össze, melyeket nem részletezek ebben a disszertációban (alapvetően Kutnyánszky Vera doktori disszertációjának anyagát jelentik), de rövid megemlékezésük szükséges a továbbiakban kifejtett eredmények kontextusba helyezéséhez.

EMSA (*electromobility shift assay*) elemzéssel mutattuk ki, hogy a TRA-1 *in vitro* köt a *goa-1* genomi régiójában található kötőhelyhez. qRT-PCR és többféle *goa-1* riporter konstrukció expressziós elemzésével bizonyítottuk, hogy a TRA-1 a konzervált kötőhelyen keresztül közvetlenül gátolja a *goa-1* transzkripcióját⁵⁴. Az erre vonatkozó méréseinket elsősorban felnőtt állatokon végeztük, mert ekkorra a GOA-1 aktivitásának megváltoztatása jellegzetesen

befolyásolja a viselkedési mintázatokat⁹². Eredményeink alapján hímekben, melyekben a TRA-1 inaktív, nagyobb mennyiségben található GOA-1 fehérje, mint hermafroditákban. Úgy tűnik, hogy ennek szerepe lehet több ivarspecifikus viselkedési mintázat kialakításában. A hímspecifikus hermafrodita feromon érzékelést, a hímspecifikus táplálékelhagyó-párkereső viselkedést, és a hím párzási folyamatának több lépését is vizsgáltuk hímekben és hermafroditákban. Eredményeink alapján a TRA-1 fehérje a *goa-1*-en keresztül szabályozza ezek ivarspecifikus megnyilvánulását⁵⁴. Ezek az eredmények a kapcsolódó cikkben⁵⁴ és Kutnyánszky Vera doktori disszertációjában (2019)¹²⁶ kerülnek kifejtésre.

6.2.3. A TRA-1 fehérje a meghatározott kötőhelyen át gátolja a *goa-1* expresszióját embriókban

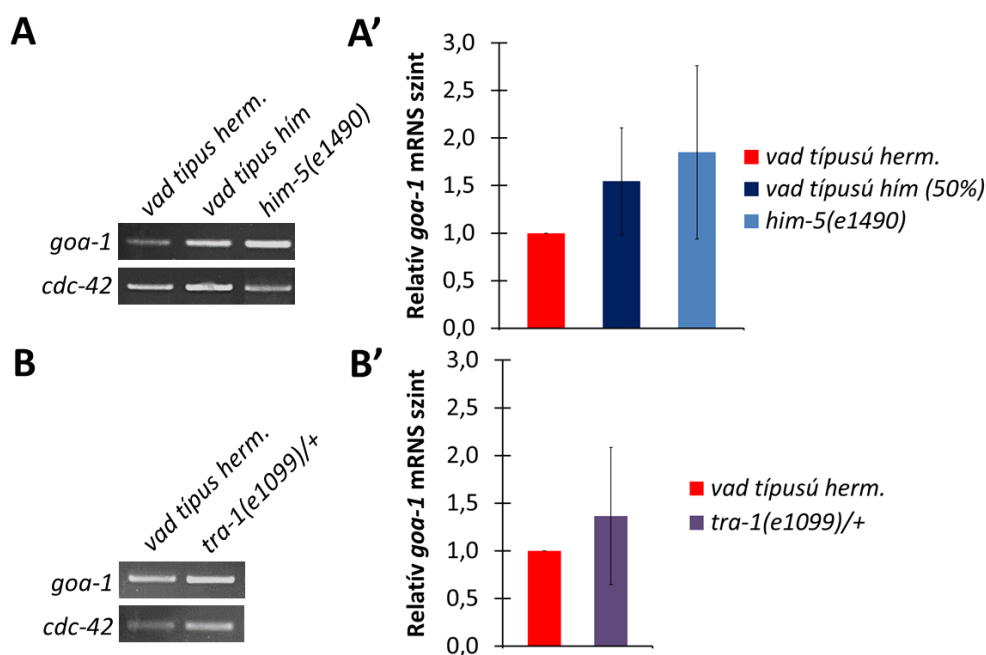
Az általunk létrehozott GOA-1::GFP (*elulIS306*) transzlációs fúziós riporter konstrukciót (17. ábra.) tartalmazó transzgénikus törzzsel nem csak felnőttekben^{54,126}, de embrionális korban is végeztünk expressziós elemzést (30. ábra). Vad-típusú genetikai háttérben (csak hermafroditák) a transzgén egy viszonylag alacsony szintű egységes (bazális) expressziót mutatott embriókban (30. ábra A, B, D és E). *him-5(e1490)* funkcióvesztéses mutáns genetikai háttérben, ahol a populáció közelítőleg 30%-a hím, körülbelül ebben az arányban jelentek meg erős GOA-1::GFP expressziót mutató egyedek (30. ábra A, B, D, E). *fem-3(e2006)* funkcióvesztéses mutáns háttérben, ami *tra-1* funkciónyerésnek feleltethető meg (nőstények), alacsonyabb GOA-1::GFP expressziós szintet kaptunk, mint vad genetikai háttérben (30. ábra A, B, D és E). *tra-1(e1099)* funkcióvesztéses törzsben ugyancsak megjelentek magas expressziós szintet mutató embriók (30. ábra A, B, D, E). Ez a törzs csak heterozigóta állapotban tartható fenn. Egy heterozigóta egyed utódainak 25%-a *tra-1(e1099)* homozigóta mutáns, melyek XX kariotípusú (pszeudo)hímek. A többi utód vad-típusú (25%) vagy heterozigóta (50%) hermafrodita, melyek fenotípusosan nem különböztethetők meg (csak utódaikon keresztül). Ebben a kísérletben *tra-1(e1099)/+* heterozigóta hermafroditák utódaiból random kiválasztott (vad és heterozigóta) hermafroditáktól származó utódpopulációt vizsgáltunk. A létrehozott utódgenerációban a *tra-1(e1099)* homozigóta (pszeudo)hímek statisztikailag várható aránya ~16,67%, ami körülbelül megegyezik a magas GOA-1::GFP expressziót mutató embriók arányával (30. ábra D).



30. ábra. A TRA-1 gátolja a *goa-1* expresszióját embriókban. (A, B) A GOA-1::GFP (*elulS306*) riporter expressziós szintje különbözhet az egyes embriókban. Vad-típusban és *fem-3(e2006)* funkcióvesztéses mutáns (*tra-1* funkciónyerésnek felel meg) háttérben, ahol csak hermafrodita és nőstény embriók vannak, minden embrió alacsony expressziós szintet mutat. *him-5(e1490)* mutáns (~30% XO hím) és *tra-1(e1099)/+* mutáns (vad és heterozigóta hermafroditák jelenléte miatt ~16,67% XX pszeudohím) genetikai hátterekben a hímeknek megfelelő arányban jelentek meg erősen világító embriók. (A, C) Az elrontott TRA-1 kötőhelyet tartalmazó *mut*GOA-1::GFP (*elulS307*) riporter expressziós szintje nem változik a vizsgált mutáns hátterekben embriókban. (D) Az intenzíven világító embriók százalékos aránya, átlaga \pm SEM formában ábrázolva. (E) Relatív GOA-1::GFP expressziós szint az erősen és gyengén világító embriókban genotípusonként. A különbség igen markáns a *him-5(e1490)* és *tra-1(e1099)/+* mutáns hátterekben. *fem-3(e2006)* funkcióvesztéses mutáns háttérben csökken az expresszió a vad-típushoz képest. Az átlag \pm SEM van ábrázolva. A képek ugyanazokkal az expozíciós beállításokkal készültek. (B, C) minden pont egy embriót jelent. Adatok és a statisztika az F6 és F7 táblázatokban (Függelék) van feltüntetve. ***: $p < 0,005$; NS: nem szignifikáns.

A hermafrodita:hím arányoknak megfelelő alacsony:magas expressziót mutató embrió arány (30. ábra D) arra utal, hogy a magas expressziós szintet mutató embriók hímek. Ez egybevág a felnőttekben kapott eredményekkel. Felnőtt hímekben erősebben fejeződött ki a GOA-1::GFP riporter konstrukció^{54,126}. Ami meglepő, hogy az embriók között sokkal nagyobb expressziós különbséget kaptunk (30. ábra E), mint felnőtt korban^{54,126}.

Elkészítettük a riporter konstrukció egy TRA-1 kötőhelyre mutáns változatát is, melyben hiányzik a kötőhely néhány, a kötés szempontjából fontos nukleotidja (17. ábra). Felnőtt korban végzett expressziós elemzéshez hasonlóan^{54,126} a mutáns riporter konstrukció [*mutgoa-1::gfp (eluIs307)*] kifejeződése nem változott meg embrionális korban a különböző mutáns hátterekben (30. ábra A és C). *him-5(e1490)* és *tra-1(e1099)/+* mutáns hátterekben nem jelentek meg erős expressziót mutató embriók, és *fem-3(e2006)* mutáns háttéren sem csökkent szignifikánsan az expresszió.



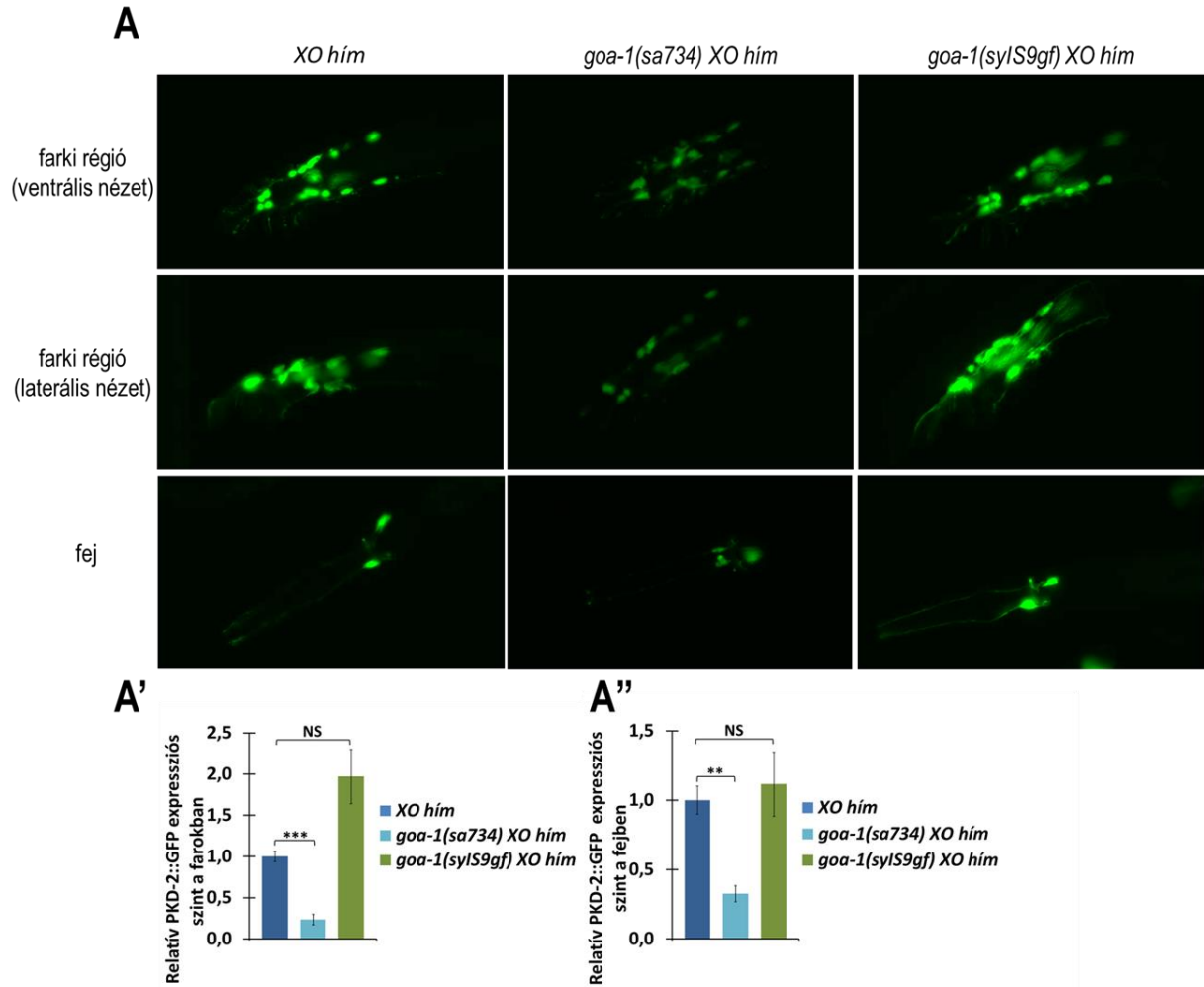
31. ábra. A *goa-1* mRNS expressziós szintje magasabb a hím embriókat is tartalmazó mintákban. A vad-típusú populációk alig (0,02%) tartalmaznak hím egyedeket. Hímekkel való keresztezés után viszont az utódpopuláció 50%-a hím lesz. *him-5(e1490)* és *tra-1(e1099)/+* funkcióvesztéses mutáns genetikai hátterekben ugyancsak vannak hímek/pszeudohímek 30%, ill. ~16,67% arányban. A hímeket is tartalmazó populációkban mindhárom esetben nagyobb volt a *goa-1* transzkriptum mennyisége, mint a csak hermafrodita embriókat tartalmazó mintában. (A, B) Reprezentatív gélképek. (A', B') Relatív *goa-1* mRNS szintek. Az átlag \pm SEM van ábrázolva. Belső kontroll: *cdc-42*-t használtam. Adatok az F8 táblázatban (Függelék) vannak feltüntetve.

Az expressziós elemzéssel kapott eredményeinket szemi-kvantitatív-PCR analízissel erősítettem meg (31. ábra). A vad-típusú hermafrodita populációval (0% hím) összehasonlítva a *goa-1* mRNS szintje szignifikánsan magasabb volt *him-5(e1490)* (~30% hím) és *tra-1(e1099)* (~16,67% hím) funkcióvesztéses mutáns hátterekben, valamint hímekkel való keresztezésből származó (50% hím) utódpopulációban (31. ábra). Mindkét mérés arra utal, hogy a TRA-1 embrionálisan is gátolja a *goa-1* transzkripcióját és ezt az általunk feltárt kötőhelyen keresztül teszi.

6.2.4. A GOA-1 szerepet játszhat az idegrendszer szex-specifikus fejlődésében

Felnőtt fonalférgekben több viselkedési mintázat esetén is kimutattuk, hogy a TRA-1 a *goa-1* gátlásán át alakít ki nemi különbségeket^{54,126}. Meglepő módon a *goa-1* expresszió igen nagy különbséget mutatott embriókban, és ez feltételezhetően a két nem között nyilvánult meg (30. és 31. ábrák). Felnőtt állatokban sokkal kisebb expressziós különbségeket tudtunk kimutatni^{54,126}. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy a GOA-1 már embrionálisan jelentős szerepet játszik az idegrendszer ivarspecifikus fejlődésében. Ezért megvizsgáltam, hogy mutatkozik-e bármilyen eltérés a *goa-1* funkcióvesztéses, ill. funkciónyeréses mutánsok idegrendszerének nemi identitásában. A PKD-2 (*human Polycystic Kidney Disease-related*) fehérje hímspecifikus neuronokban expresszálódik feji (CEM neuronok) és farki (RnB, HOB) régióban is. A CEM neuronoknak a hímspecifikus kemotaxisban (hermafroditák érzékelése), az RnB neuronoknak a párzótárs kereső és a párzó viselkedésben, a HOB neuronoknak a vulva lokalizációban van szerepe. A PKD-2 kell az érzékeléshez szükséges az egyik sejtszervecske, a cilium megfelelő lokalizációjához¹⁴¹.

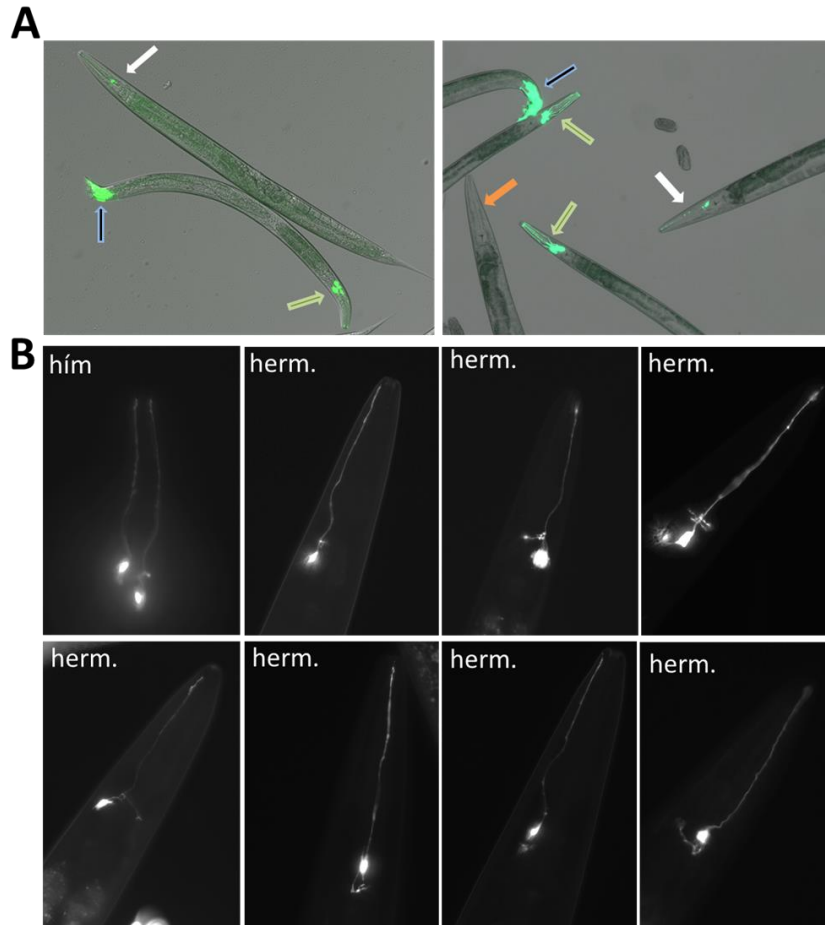
Hímekben vizsgálva a PKD2::GFP (*bxIs14*) riporter konstrukciót nem találtunk jelentősebb neuroanatómiai eltérést, míg az expressziós szintekben igen (32. ábra). *goa-1(sa734)* funkcióvesztéses mutáns hímekben, melyek hermafrodita viselkedési elemeket mutatnak a viselkedési tesztekben^{54,92}, szignifikánsan csökkent a PKD-2::GFP expressziója a feji (32. ábra A, A'') és farki régiókban (32. ábra A, A'). *goa-1(syIs9)* funkciónyeréses mutáns hímekben, melyek normális hímként viselkednek⁵⁴, nem szignifikánsan, de nőtt a PKD-2::GFP riporter konstrukció expressziója a vad-típushoz képest (32. ábra).



32. ábra. A GOA-1 befolyásolja a hím neuron-specifikus PKD-2::GFP (*bxIs14*) kifejeződését hímekben és hermafroditákban. A *pkd-2* hímspecifikus neuronokban expresszálódik a farki (RnB és HOB neuronok) és feji (CEM neuronok) régiókban. (A) A PKD-2::GFP akkumulációja *goa-1(sa734)* funkcióvesztéses mutáns fiatal felnőtt hímekben csökken, *goa-1(sylS9)* funkciónyeréses mutánsokban pedig nő mindkét régióban. (A', A'') Relatív PKD-2::GFP expressziós szintek a feji és farki régiókban hímekben. Az átlag \pm SEM értékek vannak ábrázolva. Adatok és statisztika az F9 és F10 táblázatokban (Függelék) vannak feltüntetve. ***: $p < 0,005$; NS: nem szignifikáns.

Vad-típusú hermafroditákban nincsenek jelen hímspecifikus neuronok, így bennük a *pkd-2* nem fejeződik ki. Vad-típusú hermafroditákat vizsgálva 815 állatból 1 esetben ($\sim 0,1\%$) tapasztaltam ektopikus PKD-2::GFP expressziót (F10. táblázat). Erre magyarázat lehet, hogy ritkán vad-típusú hermafroditákban sem pusztul el egy-egy CEM neuron⁴⁵. A hermafrodita viselkedést mutató *goa-1(sa734)* funkcióvesztéses mutáns hermafroditákban^{54,92,126} nem tapasztaltam PKD-2::GFP expressziót. *goa-1(sylS9)* funkciónyeréses mutáns hermafroditákban, melyek hím viselkedési mintázatot mutatnak több tesztben is^{54,92,126},

megnőtt a penetranciája a feji ektopikus PKD-2::GFP expressziót mutató hermafroditáknak (~1%) (33. ábra és F10 táblázat). Hímekben 4 darab CEM neuron van, amik a fotókon részben fedésbe kerülnek, így legtöbbször 2 fényesebb neurontest látszik és 2-3 (esetleg 4) dendrit nyúlvány (32. és 33. ábrák). Az ektopikus PKD-2::GFP expressziót mutató hermafroditákban csak 1 neurontest és 1 dendrit nyúlvány látszott, melyekben az expresszió gyengébb volt, mint hímekben. A neurontestek pontos pozíciója és a nyúlványok finomabb morfológiája változatos volt az egyes hermafroditákban (33. ábra B).



33. ábra. A *goa-1(gf)* funkciónyerékes mutáns hermafroditákban ektopikus PKD-2::GFP expresszió jelenik meg a fejben. (A) A *pkd-2* hímspecifikus neuronokban expresszálódik a feji (CEM neuronok, zöld nyíl) és farki (RnB és HOB neuronok, kék nyíl) régiókban. Hermafroditákban általában nem látunk PKD-2::GFP expressziót (narancssárga nyíl), vad-típusban legfeljebb a CEM neuronok véletlenszerű életben maradása miatt jelenhet meg kis százalékban. *goa-1(syIs9)* funkciónyerékes mutáns hermafroditák között az ektopikus *pkd-2::gfp* penetranciája megnőtt a feji régióban (fehér nyíl). Adatok az F10 és F12 táblázatokban (Függelék) láthatók. A képek fluoreszcens és Nomarski képek egymásra vetítésével készültek. (B) Az első képen egy hím feji régiója (CEM neuronok), a többin ektopikus PKD-2::GFP expressziót mutató *goa-1* funkciónyerékes mutáns hermafroditák feji régiója látható. Az ektopikus PKD-2::GFP expresszió mindig egy darab érzékelő neuronban jelent meg a fejben, melynek pontos pozíciója és alakja változatos volt. herm: hermafrodita.

Egyelőre nem tudtam biztosan megállapítani, hogy egy CEM neuron maradt életben az állatokban vagy egy másik típusú érzékelő neuron mutat ektopikus PKD-2::GFP expressziót. Látható, hogy a hímek CEM neuronjában a dendritek végén erősebb a PKD-2::GFP jel, mint a dendrit többi részén. Ez az elsődleges csilló helye, melynek membránjában a PKD-2 fehérje akkumulálódik. Ez a lokalizáció előfeltétele a megfelelő érzékelésnek¹⁴¹. *goa-1(gf)* funkciónyeréses mutáns hermafroditákban gyakran jól látható a dendrit végi erősebb PKD-2::GFP fluoreszcens jel (33. ábra B). Ezekben az állatokban is egy elsődleges csilló membránjában lokalizálódhat a PKD-2 fehérje. Hímekben és hermafroditákban végzett expressziós elemzés egyaránt arra utal, hogy a *goa-1* aktivitásnak szerepe lehet az idegrendszer ivarspecifikus mintázatának kialakításában.

6.3. Autofágia aktiváló kismolekulák vizsgálata a Huntington kór egy *D. melanogaster* modelljében

Vizsgálataink során egy teljes hosszúságú, 128 db Q ismétlést tartalmazó humán HTT-t kifejező transzgénikus törzset használtunk HD modellként (továbbiakban 128Q-HTT). Kontrollként a humán vad-típusú, 16db Q ismétlődést kifejező transzgénikus törzset (továbbiakban 16Q-HTT) használtuk. A 128Q-HTT állatok progresszív neurodegeneratív, viselkedési, motoros és elektrofiziológias tüneteket, valamint csökkent élettartamot mutattak¹⁴². Korábban a 16Q-HTT és 128Q-HTT transzgéneket csak motorneuronokban kifejeztetve vizsgálták¹⁴², a HD tünetei viszont nem korlátozódnak csak ezekre a sejtekre. Ezért egy pánneurális promóterrel rendelkező Gal4¹⁴³ rendszer segítségével fejeztettük ki a fenti transzgéneket.

6.3.1. Az AUTEN-67 és AUTEN-99 kismolekulák gátolják a neurodegeneratív tünetek kialakulását *Drosophila* HD modellben

Ebben az alfejezetben azokat az eredményeinket foglalom össze, melyeket nem részletezek ebben a disszertációban, de rövid megemlítésük szükséges a továbbiakban kifejtett eredmények kontextusba helyezéséhez.

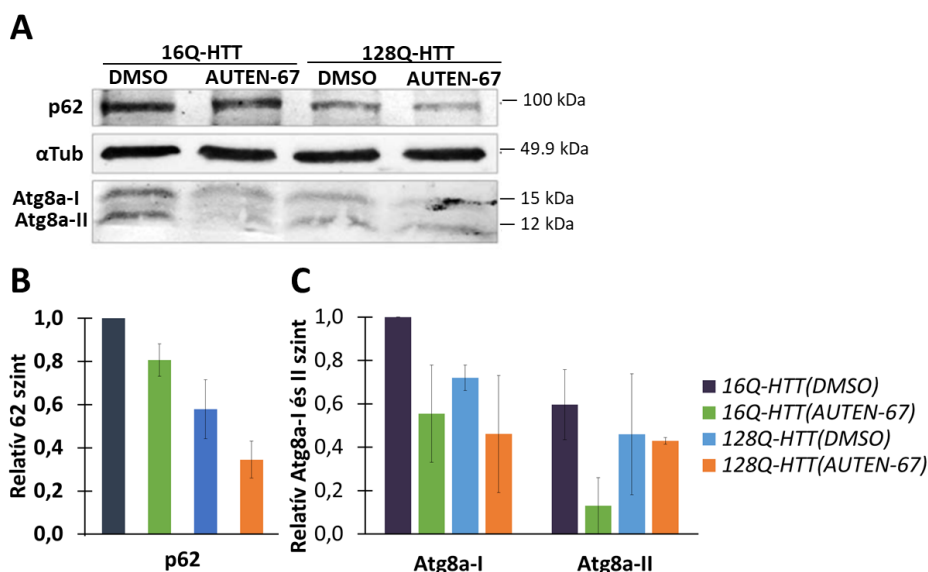
Az AUTEN-67 és -99 (*autophagy enhancer*) kismolekulák az EDTP lipid foszfatáz (az emlős MTMR14 – myotubularin-rokon foszfatáz 14 – légy ortológia) specifikus gátlásán keresztül

fokozzák az autofágiát *Drosophila* lárvális zsírtestben^{113,114}. Ezek a gyógyszerjelöltek egyrészt növelik az autofág struktúrák mennyiségét, másrészt csökkentik a Ref(2)P/p62 autofág szubsztrát és az ubikvitinált fehérjék mennyiségét *Drosophila* felnőtt agyban^{114,144}. Mindkét AUTEN kismolekula hatására csökken a szolúbilis toxikus mutáns humán HTT fehérje (128Q-HTT) mennyisége^{114,144}. Az AUTEN-67 egyaránt csökkenti a Ref(2)P/p62, ubikvitinált fehérjék, és a 128Q-HTT tartalmú zárványok mennyiségét 21 napos HD modellállatokban¹⁴⁴. A kismolekula továbbá javítja a repülési képességet és növeli a *Drosophila* HD modell élettartamát¹⁴⁴. Mindkét AUTEN javítja az állatok mászóképeségét^{114,144}. Ezek az eredmények a kapcsolódó cikkekben^{113,114,144}, valamint Billes Viktor (2017)¹¹² és Kovács Tibor (2018)¹⁴⁵ doktori disszertációjában kerültek bemutatásra.

6.3.2. Az AUTEN-67 több ponton is serkenteni az autofág aktivitást egy *Drosophila* HD modellben

Drosophila-ban korábban csak a lárvális zsírtestben lett kimutatva, hogy az AUTEN-67 serkenti az autofág aktivitást¹¹³. Kísérleteinkben azonban neuronokban is szeretnénk volna vizsgálni az AUTEN-67 potenciális terápiás hatását az agy öregedése során. Az autofág fluxus vizsgálatához az Atg8a-I (nem aktivált szolúbilis forma), Atg8a-II (aktivált lipid-konjugált forma) és Ref(2)P/p62 riporter fehérjék mennyiségét elemeztem *Western blot* analízissel 21 napos 16Q-HTT és 128Q-HTT *Drosophilák* fejében (34. ábra). A szolúbilis Atg8a-I és membrán-kötött Atg8a-II fehérjék relatív mennyisége információt nyújthat arról, hogy az autofágia folyamatának mely lépéseiben történik változás a kezelés hatására. Az Atg8a-I mennyiségét az Atg8a-I keletkezése, valamint az Atg8a-I → Atg8a-II átalakulás (autofagoszóma képződés) befolyásolja. Az Atg8a-II mennyiségét az Atg8a-I → Atg8a-II átalakulás (autofagoszóma képződés) és az Atg8a-II bomlása (autolizoszóma belső membránjának lebomlása) határozza meg. Az Atg8a *Western blot* eredmények önmagukban nem értelmezhetők, mivel ugyanaz az eredmény több, akár ellentétes folyamat következménye is lehet¹⁴⁶. Megfelelő értelmezésükhöz először a teljes autofág fluxus változásával kell tisztában lennünk. Erre a Ref(2)P/p62 autofág szubsztrát mennyiségének változásából következtethetünk. A Ref(2)P/p62-re vonatkozó eredményeink már szerepelnek

Billes Viktor doktori disszertációjában¹¹², de itt is bemutatom őket (34. és 35. ábrák), hogy követhető legyen az Atg8a eredmények értelmezése.



34. ábra. Az AUTEN-67 több lépésben is serkenti az autofágiát egy *Drosophila* HD modellben. (A, B) Az AUTEN-67 kismolekula a 16Q-HTT és 128Q-HTT transzgénikus legyekben is csökkenti a Ref(2)P/p62 fehérje mennyiségét. Ez arra utal, hogy a hatóanyag fokozza az autofág fluxust. (A, C) AUTEN-67 hatására csökken a nem aktivált Atg8a-I mennyisége 16Q-HTT és 128Q-HTT állatokban egyaránt. Kezelés hatására az aktivált (membrán-kötött) Atg8a-II szintje csökken 16Q-HTT állatokban, míg 128Q-HTT állatokban nem változik meg. Ezek alapján az AUTEN-67 az autofagoszóma képződésre és érésre is hatással lehet. A fehérje minták 21 napos állatok fejéből származtak. Belső kontrollként α Tub84B szolgál. (A) Egy reprezentatív *Western blot* kísérlet képe. (B, C) kvantifikált adatok. A diagramokon szereplő értékek korrigálásra kerültek a belső kontroll (α Tub84B) értékekkel, majd normalizálva lettek a 16Q-HTT kontroll (csak DMSO) mintákat 1-nek véve. Az átlag \pm SEM értékek vannak ábrázolva. 16Q-HTT: nem patológiás humán HTT transzgént kifejező állatok; 128Q-HTT: patológiás humán HTT transzgént kifejező állatok. Adatok az F11 táblázatban (Függelék) vannak feltüntetve.

AUTEN-67 kezelés hatására a 16Q-HTT állatokban csökkent a Ref(2)P/p62 mennyisége a kontrollhoz (DMSO-kezelt) képest (34. ábra A, B). Az AUTEN-67 tehát fokozza az autofágia aktivitását ezekben az állatokban. AUTEN-67 kezelés hatására csökken a szolúbilis Atg8a-I fehérje mennyisége is (34. ábra A, C). Ez azt jelzi, hogy az Atg8a-I \rightarrow Atg8a-II átalakulás fokozódik. Mivel AUTEN-67 kezelés hatására a membrán-kötött Atg8a-II mennyisége is csökkent (34. ábra A, C), a fokozott mértékben képződött Atg8a-II fokozottabb mértékben bomlott le. Ezen eredmények alapján az AUTEN-67 képes az autofagoszóma képződést és az autofagoszóma érést is fokozni.

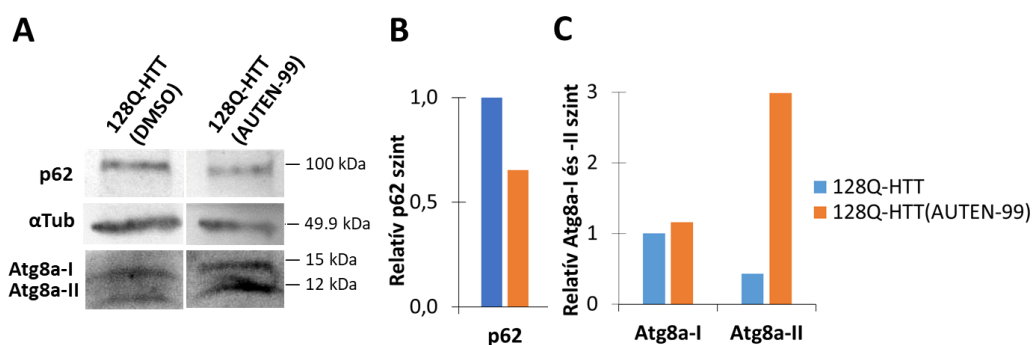
A DMSO-val kezelt (AUTEN-67 kontrollja) 128Q-HTT modellben alacsonyabb volt a Ref(2)P/p62 szintje, mint a DMSO-val kezelt 16Q-HTT állatokban (34. ábra A, B). Ez azt jelentené, hogy a 128Q-HTT állatokban intenzívebb az autofágia, ami ellentmond az irodalmi adatoknak¹⁴⁷. Felmerült, hogy a 128Q-HTT állatokban az alacsonyabbnak látszó Ref(2)P/p62 szint fokozott zárványképződés következménye lehet, mert az általunk használt fehérjeizoláló eljárással csak az szolúbilis fehérjéket lehet izolálni. A feltételezés alapját az adta, hogy HD betegekben jelentős fehérjeaggregátum- és zárványképződés történik az idegsejtekben, mely zárványok Ref(2)P/p62 tartalmúak lehetnek^{120,147}. Ref(2)P/p62 tartalmú zárványok fokozott képződését immunhisztokémiai elemzéssel bizonyítottuk¹⁴⁴. A 128Q-HTT állatokban összességében jóval magasabb a Ref(2)P/p62 szint, csak a fehérje jelentős része oldhatatlan formában van jelen fehérjeaggregátumokba zárva^{112,144}. Az irodalmi adatoknak megfelelően tehát valószínűleg csökken az autofág fluxus intenzitása 128Q-HTT modellállatokban a kontroll 16Q-HTT állatokhoz képest.

A DMSO-val kezelt 128Q-HTT muslicákban az Atg8a-I és Atg8a-II szintjei kismértékben csökkentek a DMSO-val kezelt 16Q-HTT állatokkal összehasonlítva (34. ábra A, C). Az Atg8a-I alacsonyabb szintje alapvetően két ok miatt alakulhat ki. Egyrészt kevesebb Atg8a fehérje képződhet, mivel a mutáns 128Q-HTT fehérje befolyásolhatja a transzkripció folyamatát¹²². Ebben az esetben az Atg8a-II szintjének csökkennie kellene vagy változatlanul maradnia, attól függően, hogy milyen intenzív az Atg8a-II bomlása. Másrészt intenzívebb lehet az Atg8a-I → Atg8a-II átalakulás a 128Q-HTT állatokban. Mivel a Ref(2)P/p62 eredmények alapján az autofágia kapacitása alacsonyabb 128Q-HTT állatokban, ebben az esetben csak akkor csökkenhet az Atg8a-II mennyisége, ha a többlet zárványokba kerül.

AUTEN-67-kezelt 128Q-HTT állatokban csökkent a Ref(2)P/p62 mennyisége a kontrollhoz (DMSO) képest (34. ábra A, B). Ez arra utal, hogy az AUTEN-67 fokozza az autofág aktivitást ezekben az állatokban is. AUTEN-67 kezelés hatására az Atg8a-I szintje csökkent (34. ábra A, C). Ha kevesebb Atg8a fehérje képződne, akkor az autofág fluxus nem növekedhetne. Ezért valószínűbb, hogy 128Q-HTT állatokban AUTEN-67 hatására fokozódik az Atg8a-I → Atg8a-II átalakulás, vagyis fokozódik az autofagoszóma képződés. Mivel a kezelés hatására az Atg8a-II mennyisége nem változott meg, a többlet Atg8a-II vagy lebontásra került (fokozott autofagoszóma érés) vagy fehérje aggregátumokba záródott.

6.3.3. Az AUTEN-99 serkenti az autofág aktivitást egy *Drosophila* HD modellben

Az AUTEN-99 autofág fluxusra gyakorolt hatását ugyancsak az Atg8a-I, Atg8a-II és Ref(2)P/p62 fehérje mennyiségi elemzésével vizsgáltam meg 21 napos 128Q-HTT állatok agyában (35. ábra). 128Q-HTT állatokban az AUTEN-99 kezelés hatására csökkent a Ref(2)P/p62 fehérje szintje (35. ábra A, B), ami arra utal, hogy az AUTEN-99 kezelés növeli az autofág fluxust. A kezelt állatokban megnőtt az Atg8a-I és Atg8a-II fehérjék mennyisége a kontrollhoz (DMSO-kezelt 128Q-HTT) képest, és arányuk megfordult (35. ábra A, C). Ez akkor lehetséges, ha az AUTEN-99 kezelés hatására több Atg8a fehérje keletkezik és az autofagoszóma képződés fokozódik, míg az autofagoszóma érés nem (vagy alig) változik. Meg kell jegyezni, hogy míg a Ref(2)P/p62 fehérje mennyiségi meghatározása több technikai párhuzamos segítségével történt, addig az Atg8a-I és Atg8a-II mennyiségére csak egyetlen *Western blot* eredményem van, így ennek megbízhatósága egyelőre vitatható.



35. ábra. Az AUTEN-99 serkenti az autofágiát egy *Drosophila* HD modellben. (A, B) Az AUTEN-99 kismolekula 128Q-HTT állatokban csökkenti a Ref(2)P/p62 szintjét, ami arra utal, hogy fokozza az autofág fluxust. (A, C) AUTEN-99 kezelés hatására növekszik az Atg8a-I és Atg8a-II fehérjék mennyisége 128Q-HTT állatokban. Ez arra utal, hogy a kismolekula az Atg8a képződésére lehet elsősorban hatással, és csak kisebb mértékben hat az autofagoszóma képződésre és érésre. A fehérjeminták 21 napos állatok fejéből származtak. Belső kontrollként αTub84B szolgált. (A) Reprezentatív *Western blot*. (B, C) kvantifikált adatok. A diagramokon szereplő értékek korrigálásra kerültek a belső kontroll (αTub84B) értékekkel, majd normalizálva lettek a 128Q-HTT kontroll (csak DMSO) mintákat 1-nek véve. Átlag értékek vannak ábrázolva. 128Q-HTT: patológiás hosszúságú humán HTT-t kifejező állatok. Adatok az F12 táblázatban (Függelék) vannak bemutatva.

7. Következtetések

7.1. Az élettartam és idegrendszeri funkciók ivarspecifikus szabályozását *C. elegans*-ban a szex-determinációs génkaskád irányítja

A nemek közötti különbségek háttérében álló genetikai mechanizmusok vizsgálatára kiváló modellszervezet a *C. elegans*. A szex-determinációs genetikai útvonal biztosítja, hogy az állat minden testi sejtje a megfelelő nemi identitás szerint fejlődjön. Az útvonal *downstream* (effektor) transzkripciós faktora a TRA-1, amely hermafroditákban aktív, míg hímekben inaktív³². Csoportunk *in silico* módszerekkel korábban meghatározta a TRA-1 konszenzus kötőszekvenciáját⁴⁸. Doktori munkámban két potenciális TRA-1 célgénrel foglalkoztam, a *daf-16*-tal és a *goa-1*-gyel, melyek genomi környezetében konzervált TRA-1 kötőhelyeket azonosítottunk.

7.1.1. A TRA-1 a *daf-16* transzkripcionális szabályozásán keresztül hat az élettartamra

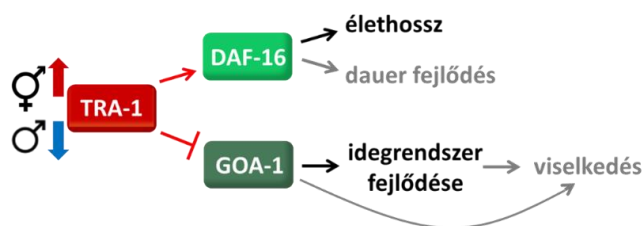
A *daf-16* gén az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal transzkripciós faktorát kódolja, szerepe van a fejlődés, öregedés, anyagsere, immunitás és különböző stresszválaszok szabályozásában^{52,139}. Az öregedés szabályozásában központi szerepet játszó *d/f* izoforma szabályozó régiójában elhelyezkedőt TRA-1 kötőhelyet vizsgáltam doktori munkám során.

A legtöbb ivari dimorfizmust mutató állatfajhoz hasonlóan *C. elegans*-ban is különbözik a nemek élettartama, de a tartási körülmények nagymértékben befolyásolhatják ezt a szexuális dimorf karaktert. Véleményünk szerint a nagy hermafrodita túlsúllyal rendelkező vegyes populációk biztosítják a természetes körülményekhez legközelebb álló egyedi és szociális környezetet. Ezért ilyen tartási körülmények között végeztem méréseimet, melyek szerint a vad-típusú hermafroditák tovább élnek, mint a hímek (19. és 20. ábra). Ez a nemi különbség azonban eltűnik *daf-16* funkcióvesztéses mutáns háttérben (20. ábra). Ez arra utal, hogy az élettartamban megfigyelhető nemi különbség *daf-16*-függő módon alakul ki *C. elegans*-ban. Kimutattam, hogy a szex-determinációs útvonal szerepet játszik az élettartam szabályozásában (a TRA-1 fehérje aktivitása növeli az állatok élettartamát) (21. ábra), és hogy a *daf-16(lf)* mutációk szuppresszálják a szex-determinációs útvonal hatását a hermafroditák

hosszabb élettartamára (22. ábra). A TRA-1 és a DAF-16 tehát azonos genetikai útvonalban hatnak az öregedési folyamat szabályozásában.

Bizonyítottam, hogy a TRA-1 fehérje közvetlenül a feltárt kötőhelyen át specifikusan serkenti a *daf-16 d/f* izoforma transzkripcióját (23-26. ábrák). A *daf-16* tehát egy új TRA-1 célgén. Meglepő módon a TRA-1 transzkripció aktivátorként működik a feltárt kapcsolatban. Egy kivétellel⁴⁴ a TRA-1-et eddig represszorként írták le³². Ugyanakkor a TRA-1 humán megfelelői (GLI fehérjék) szintén aktivátor és represszor szerepet is betölthetnek¹⁴⁸. Ugyancsak újszerű, hogy a TRA-1 transzkripció szinten szabályozza a *daf-16*-ot, mivel korábban elsősorban a DAF-16 poszttranszlációs szabályozói voltak ismertek, de a DAF-16 aktivitás transzkripcionális szintű szabályozására egyre több példa áll rendelkezésre^{52,78,79}.

Irodalmi adatok szerint a *daf-16d/f* izoforma transzkripciójának növelése elég lehet az élettartam növeléséhez. Az *lpIS14* funkcionális *daf-16* riporter konstrukciót tartalmazó transzgenikus törzsekben nő az élettartam a kópiaszám függvényében^{79,81}, valamint a SWI/SNF kromatin átalakító komplex is képes növelni az élettartamot a *daf-16* transzkripcionális szabályozásán keresztül¹⁴⁹. Eredményeim szerint a hermafroditákban aktív TRA-1 hatására nagyobb mennyiségben jelen lévő DAF-16D/F izoforma okozhatja megnövelt élettartamukat (27. ábra). Az öregedés ivarspecifikus aspektusa tehát genetikai kontroll eredménye (36. ábra).



36. ábra. A TRA-1 a *daf-16* és a *goa-1* közvetlen transzkripcionális szabályozásán át alakít ki nemi különbségeket több tulajdonságban. A TRA-1 hermafroditákban aktív (vastag piros nyíl), hímekben inaktív (vastag kék nyíl). Hermafroditákban a TRA-1 a *daf-16* (*d/f* izoforma) transzkripciójának serkentésén át (piros nyíl) alakítja ki a megnövelt élettartamot. A TRA-1 a *daf-16* (*b* izoforma) transzkripcionális szabályozásán keresztül alakít ki nemi különbségeket a dauer lárva fejlődésben²². A *goa-1* transzkripciójának gátlásán át (piros talpas nyíl) a TRA-1 úgy tűnik, befolyásolja az idegrendszer ivarspecifikus mintázatát, illetve ettől függetlenül is hatással lehet az ivarspecifikus viselkedési mintázatokra. Szürke jelölés: a doktori disszertációban nem, csak a kapcsolódó cikkekben^{22,54} részletezett eredmények alapján levont következtetések.

2013-ban Berkseth és mtsai. azonosítottak két potenciális TRA-1 kötőhelyet a *daf-16* genomi régiójában⁴², ami megerősíti, hogy a *daf-16* a TRA-1 közvetlen szabályozása alatt állhat. Meglepő, hogy az általuk talált TRA-1 kötőhelyek pontos pozíciója kissé eltér a mi általunk azonosítottaktól. A TRA-1 kötőhelyeket *in silico* módszerrel határoztuk meg a *daf-16* genomi régióban, és ChIP-qPCR és expressziós analízisekkel ellenőriztük azok funkcionalitását. Ezek jóval érzékenyebb eljárások, mint a Berkseth-ék által alkalmazott ChIP-seq. Ezen utóbbi módszerrel több eddig megismert TRA-1 célgént (pl. *egl-1*, *ceh-30*, *lin-39*) nem is sikerült azonosítaniuk⁴².

A *daf-16* izoformák közül az *a* izoforma több funkcióban, köztük az öregedés szabályozásában is szerepet tölt be^{80,81}. Munkám során nem vizsgáltam ezt az izoformát, mert viszonylag messze helyezkedik el a feltárt TRA-1 kötőhely(ek)től. Egyes adatok szerint az *a* izoforma két transzriptuma közül az egyiknek megegyezik a promótere a *d/f* izoforma promóterével⁸⁰. Ez alapján az általunk azonosított kötőhely befolyásolhatja az *a* izoforma expressziós szintjét is, így véleményem szerint érdemes lenne ezt is megvizsgálni a jövőben.

A TRA-1 feltehetően minden DAF-16 funkciót befolyásolhat. Az élettartamhoz hasonlóan nemi különbségeket írtak le a dauer fejlődésben¹⁸, a tanulási képességekben^{17,27-31}, az anyagcserében és stressz-rezisztenciában is²⁶. Azt már bizonyítottuk, hogy a dauerfejlődés valóban a szex-determinációs útvonal szabályozása alatt áll²², de a jövőben érdemes lenne megvizsgálni a többi folyamatot is.

7.1.2. A TRA-1 a *goa-1* transzkripcionális szabályozásán keresztül befolyásolja a viselkedést és az idegrendszer fejlődését

A *goa-1* a *C. elegans* egyetlen Gai/o ortológja (heterotrimer G fehérje α alegységének egyik típusa). Számos olyan neuronális funkció és viselkedés szabályozásában van szerepe, melyekben ugyancsak nemi különbségeket írtak le^{53,90}. Munkatársaimmal kimutattam, hogy a TRA-1 fehérje a csoportunk által azonosított kötőhelyen keresztül közvetlenül gátolja a *goa-1* transzkripcióját. Felnőtt hermafroditákban szignifikánsan alacsonyabb a *goa-1* szintje, mint hímekben. A TRA-1 – *goa-1* szabályozási kapcsolat szerepet játszik több ivarspecifikus viselkedési mintázat kialakításában is. Ezen eredményeink Kutnyánszky Vera doktori

disszertációjában¹²⁶ és a kapcsolódó cikkben⁵⁴ kerülnek kifejtésre. Jelen dolgozatban azt elemeztem részletesebben, hogy a feltárt szabályozási kapcsolatnak lehet-e szerepe embrionális korban az idegrendszer ivarspecifikus jellegzetességeinek kialakulása során.

Eredményeim alapján a TRA-1 fehérje közvetlenül a meghatározott kötőhelyen át specifikusan represszálja a *goa-1* transzkripcióját embriókban (30. és 31. ábrák). Csak hermafroditákat vagy nőtényeket tartalmazó populációkban a *goa-1* expressziós szintje egységes és viszonylag alacsony volt embrionális korban, míg a hím embriókat is tartalmazó mintákban erős expressziós szintet mutató embriók is megjelentek (30. ábra A és B). A hermafrodita:hím arányoknak megfelelő alacsony:magas expressziót mutató embriók aránya a különböző mintákban (30. ábra D) arra utal, hogy a magasabb expressziós szintet mutató embriók hímek voltak. Ez egybeesik azzal, hogy felnőtt korban a hímekben magasabb a *goa-1* expressziós szintje^{54,126}.

Berkseth és munkatársai nem tudták a *goa-1*-et TRA-1 célként azonosítani⁴². Mivel azonban számos más ismert TRA-1 célként sem tudtak kimutatni ChIP analízisükben, ez a hiányosság nem evidencia értékű eredményeinkkel szemben. A ChIP kísérletben ráadásul nem vizsgálták az embrionális stádiumokat, míg a TRA-1 – *goa-1* szabályozási kapcsolat eredményeink szerint ebben a korban a legmarkánsabb (30. ábra és ^{54,126}).

Embriónális (30. ábra) és felnőtt^{54,126} korban végzett vizsgálataink is alátámasztják, hogy a *goa-1* egy újonnan azonosított TRA-1 célként. A GOA-1 (G jelátvitel) által szabályozott idegi funkciók tehát ivarspecifikus módon nyilvánulhatnak meg. Mivel a TRA-1 – *goa-1* szabályozási kapcsolat gátló jellegű, a *goa-1* mutációk szétkapcsolhatnak számos idegi funkciót és neuroanatómiai tulajdonságot az állat aktuális kromoszómális nemétől (36. ábra), amelyet eredményeink igazoltak (32. és 33. ábra és ^{54,126}).

A *C. elegans* idegrendszerben korábban több szinten (neuroanatómia, expressziós mintázat, szinaptikus kapcsolati hálózat) mutattak ki nemi különbséget^{17,29}. Bármelyik szint eltérése a nemi jellegektől az ivarspecifikus viselkedési mintázat megváltozásához vezethet^{17,29}. Jelen munkámban kimutattam, hogy egy hímspecifikus idegrendszeri marker (PKD-2::GFP) expressziós szintje megváltozik az abberáns ivarspecifikus viselkedési mintázatot mutató *goa-1* mutáns hímekben (32. ábra). Az eredmény arra utalhat, hogy a GOA-1 befolyásolhatja bizonyos neuronok expressziós mintázatát, hatással lehet az idegrendszer nemi identitására.

Bár neuroanatómiai különbségeket nem figyeltem meg ezen elemzések során, de nem zárható ki, hogy finomabb változások (pl szinaptikus hálózat apróbb módosulásai) esetleg előfordulnak.

Hím-specifikus viselkedési mintázatot mutató *goa-1(gf)* funkciónyeréssel mutáns hermafroditák között a PKD-2::GFP hím-specifikus marker ektopikus expresszióját tapasztaltam a feji régióban (33. ábra). Ebben a régióban hímekben a PKD-2::GFP a CEM neuronokban fejeződik ki, melyek az embrionális fejlődés során a hermafroditákban is létrejönnek, de még ebben a stádiumban apoptotikus sejthalállal elpusztulnak⁴⁵. Vad-típusú felnőtt hermafroditákban a PKD-2::GFP nem fejeződik ki. Méréseimben vad-típusú hermafroditákban 1 esetben (~0,1%-os penetrancia) ektopikus expressziót figyeltem meg a fejben (33. ábra és F10 táblázat). Ennek magyarázata az lehet, hogy néha nem az összes CEM neuron pusztul el hermafroditákban⁴⁵. A vad-típushoz képest azonban jóval nagyobb penetranciával (~1%) jelent meg ektopikus PKD-2 expresszió a *goa-1(gf)* funkciónyeréssel mutáns hermafroditák feji régiójában (33. ábra és F10 táblázat). Ez az eredmény is arra utal, hogy a *goa-1*-nek szerepe lehet az idegrendszer ivarspecifikus mintázatának kialakulásában. Ezekben az állatokban a PKD-2::GFP expresszió szintje minden esetben gyengébb volt, mint hímekben (33. ábra). Valamint míg hímek fejében a riporter konstrukció a 4 db CEM neuronban fejeződik ki, addig a *goa-1(gf)* mutáns hermafroditák esetében csak 1 neuronban figyeltünk meg GFP jelet. A pozitív sejtek pontos pozíciója és a dendritek finomszerkezete a hermafroditák között változatos volt (33. ábra). További vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy eldöntsük, hogy a *goa-1(gf)* mutáns hermafroditákban mely neuronokban történik az ektopikus PKD-2::GFP expresszió. Lehetséges, hogy ezekben a hermafroditákban nagyobb százalékkal maradnak életben CEM neuronok. A részleges maszkulizáció miatt hermafroditákban nagyobb arányban életben maradó CEM neuronokra ugyanis változatosabb differenciáció (pozíció, alak) jellemző⁴⁵. Lehetséges, hogy a *goa-1(gf)* mutáns hermafroditákban egy másik, egyébként is jelen lévő neuron expressziós mintázata, vagy esetleg nemi identitása változik meg. Az ektopikus expressziót mutató neuronok alakja alapján egy érzékelő neuronról lehet szó. A legvalószínűbb jelöltek az úgynevezett amphid neuronok. Ezek sensillája egy feji „érzékszerv”, amely egy elsősorban a külső kémiai ingereket érzékelő idegsejtek dendrit végződéseit és támasztó/segítő sejteket tartalmazó képlet. Az amphid neuronok közül többnek is központi szerepe van az ivarspecifikus érzékelésben és viselkedésben. Az AWA, AWC, ASK neuronok esetében kísérletesen

bizonyított, hogy ha korai fejlődési szakaszban távolítjuk el valamelyiket, akkor a többiek képesek átvenni és pótolni szerepét^{93,150,151}. Az ektopikus PKD-2::GFP-t kifejező neuronok alakja ezekre is hasonlít, bár nem azonos. Az ektopikus expresszió esetén a dendritek végén látható erősebb PKD-2::GFP jel arra utal, hogy a hímekhez hasonlóan a *goa-1(gf)* mutáns hermafroditákban is az itt található elsődleges csilló membránjába lokalizálódik a PKD-2 fehérje¹⁴¹.

Az utóbbi években kimutatták, hogy a *daf-7*, mely egy *TGFβ* családba tartozó neuroendokrin ligandumot kódol és számos viselkedés és élettani folyamat szabályozásában részt vesz, ivarspecifikus expresszióval és funkcióval is rendelkezik^{150,152,153}. Tudjuk, hogy a *goa-1* szabályozza a *daf-7* expresszióját¹⁵⁴, de nem ismert ennek a szabályozási kapcsolatnak a pontos funkciója. Bár a *daf-7* bizonyos ivarspecifikus folyamatokban a PDF-1 (*pigment dispersing factor*) szabályozása alatt áll¹⁵⁵, ugyanakkor érdekes lenne megvizsgálni, hogy a *goa-1* ivarspecifikusan szabályozza-e a *daf-7*-et.

7.1.3. A feltárt szabályozási kapcsolatok lehetséges szerepe emberben

Noha az emlős és nematoda szex-determináció alapvetően különbözik, ugyanakkor az általunk vizsgált fehérjéknek mind van humán ortológja, így érdemesnek tartottuk megvizsgálni, hogy lehet-e köztük hasonló szabályozási kapcsolat.

A TRA-1 fehérje humán megfelelői a GLI fehérjék, melyek a Hedgehog (Hh) jelátviteli útvonal *downstream* effektorai. Emlősökben ez az útvonal fontos szerepet tölt be a fejlődésben, az embrionális mintázatok kialakulásában, szervek morfogenezisében és szabályozza a növekedést^{40,148}. *C. elegans*-ban nincs kanonikus Hh útvonal, bár egyes tagjai jelen vannak¹⁵⁶. Emlősökben 3 GLI fehérje van (Gli1, Gli2, Gli3), melyek különböző részfolyamatok szabályozásában vesznek részt. A Gli1 elsősorban aktivátor, míg a Gli2 és Gli3 aktivátor és represszor is lehet^{40,148}. A Hh jelátvitel szerepet játszik az emlős szexuális differenciációban is, az ivarmirigyek és ivarszervek kialakulása során¹⁵⁷. Ennek alapján más szervek szexuális differenciációjában is funkciója lehet, bár erre vonatkozóan még nem történtek vizsgálatok. A FEM-1 emlős homológja a Fem1b fehérje, mely részt vesz a Gli1 fehérje ubikvitinizációjában és gátolja annak aktivitását¹⁵⁸.

Az inzulin/IGF-1 útvonal rendkívül konzervált és minden rendszertani kategóriában fontos szerepet tölt be az élettartam szabályozásában az állatvilágban. Míg a gerinctelenekben egy *FoXO* gén van, addig a gerincesekben négy (*FoXO1*, *FoXO3*, *FoXO4*, *FoXO6*). Emlősökben a *FoXO* fehérjék fontos szerepet töltenek be számos, igen változatos sejt folyamat szabályozásában (pl. stressz-rezisztencia, anyagcsere, sejtciklus, apoptózis, és élettartam)¹³⁹. Bár az inzulin/IGF-1 és Hh útvonalak kapcsolatának felderítésére még kevés vizsgálat irányult, egyes folyamatokban a Hh befolyásolni tudja az inzulin/IGF útvonal működését^{159,160}. Emlősökben az inzulin/IGF-1 útvonalnak szerepe lehet ivarspecifikus szervfejlődési folyamatokban¹⁶¹.

Ezek alapján érdemesnek tartottuk megvizsgálni, hogy a *C. elegans*-ban feltárt szabályozási kapcsolat jelen lehet-e emlősökben. GLI kötőhelyet találtunk a *FoXO3* gén első intronjában, mely erős konzerváltságot mutatott az emlősök között (28. ábra). A *FoXO3* gén az egyik legfontosabb ismert élettartam szabályozó gén emberben. A génben található SNP-eket több népcsoport esetén is összefüggésbe hozták a kivételesen hosszú életkorral. Ezek az SNP-k főleg introni régiókban találhatók, ami alapján valószínűbb, hogy a *FoXO3* expressziós szintjét befolyásolják és nem a fehérje aktivitását¹³⁹. Ezek alapján az általunk feltárt molekuláris szabályozási kapcsolat (TRA-1 – *daf-16*) konzervált lehet akár emberben is (GLI – *FoXO3*), és befolyásolhatja a nemi különbségeket az élettartamban és más folyamatokban is.

Ahogy *C. elegans*-ban, úgy emlősök közt is elsősorban az α alegység biztosítja a heterotrimer G fehérjék funkcionális diverzitását. Emlősöknél 4 α alegység család található és mindegyiknek több tagja van. A GOA-1 a Gi/o osztály egyetlen biztos *C. elegans* ortológja. A Gao emlősökben jelentős idegrendszeri expressziót mutat és fontos szerepet játszik a szinaptikus neurotranszmisszióba és az idegrendszer fejlődésében^{90,162}. *In silico* elemzéssel konzervált GLI kötőhelyeket találtunk humán Gai/o génekben is^{54,126}. Emberben szintén vannak nemi különbségek a viselkedésben, érzékelésben és számos neurológiai folyamatban (például skizofrénia), melyek hátterében a Gai/o fehérjék differenciált (ivarspecifikus) működése is állhat.

Az emberben *in silico* talált GLI kötőhelyek biztatóak, de a kapcsolatok megerősítése kísérleteket igényel. Ugyanakkor megoldni látszik az a felfogás, hogy emlősökben az ivarmirigyek kialakulása után a termelődő hormonok hatásán alapszik az összes nemi

különbség kialakulása. Egyre több kísérletes eredmény szerint a nemi hormonoktól függetlenül a sejtek saját kromoszomális neme is hatással van az ivarspecifikus tulajdonságok kifejeződésére akár az idegrendszer, akár az élettartam szabályozásában^{29,163}. Ennek alapján több hasonlóság lehet a nemi különbségeket kialakító mechanizmusokban gerinctelenek és gerincesek között, mint ahogy azt korábban gondolták²⁹.

7.2. Az AUTEN-67 és -99 kismolekulák potenciális terápiás hatóanyagok neurodegeneratív betegségek kezeléséhez

Az agy öregedésének késleltetéséhez és a neurodegeneratív betegségek kezeléséhez a fokozott mértékben keletkező aberráns fehérjéket, illetve aggregátumaikat kellene hatékonyan eltávolítani^{106,107}. Az autofágia az egyik legjelentősebb sejttes folyamat a károsodott citoplazma komponensek eltávolításában, így számos terápiás megközelítés alapszik az autofágia fokozásán^{59,106}. Ezek legtöbbször azonban olyan molekulákat céloz meg, melyek más sejt folyamatban is szerepet játszanak, így jelentős mellékhatásokat okozhatnak¹⁰⁶. Egy sokkal specifikusabb terápiás célpont lehet az MTMR14 (myotubularin-szerű lipid foszfatáz), mely az autofagoszóma létrejöttéhez szükséges PI3P szintjét szabályozza negatívan¹¹⁰. Az MTMR14 tehát az autofágia közvetlen szabályozó faktora. Munkánk során két MTMR14-gátló kismolekula (AUTEN-67 és -99) hatását vizsgáltuk *Drosophila* HD modellben. Eredményeink nagyobb része már leírásra került Billes Viktor doktori disszertációjában^{112,145}, jelen disszertációban azt elemeztem, hogy az autofágia mely lépésére hathatnak pontosan ezek a kismolekulák.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy magasabb az autofág aktivitás a nem patogén humán fehérjét (16Q-HTT) kifejező állatokban, mint a patogén humán fehérjét (128Q-HTT) kifejező állatokban, ami megfelel az irodalmi adatoknak¹⁴⁷. Ugyanakkor a Ref(2)P/p62 (egy autofágia szubsztát) fehérjék nagy része a 128Q-HTT állatokban nagymértékben felszaporodott zárványokban található^{112,144}. Bár a HD-re jellemző a p62-tartalmú zárványok felszaporodása¹²⁰, ugyanakkor ez az eredmény meglepő volt, hiszen ezzel a teljes hosszúságú mutáns HTT-t kifejező konstrukcióval nem figyeltek meg fehérje aggregátumokat korábban¹⁴². Ez a különbség fakadhat abból, hogy míg korábban lárvális motorneuronokban

vizsgálták a mutáns HTT megjelenését¹⁴², addig mi felnőtt agyban mutattunk ki fehérje aggregátumokat¹⁴⁴.

Az AUTEN-67 kezelés növelte az autofág aktivitást a 16Q-HTT állatokban (34. ábra A és B és Billes, 2018¹¹²). Eredményeink szerint ez két ponton valósul meg. Az AUTEN-67 az autofagoszóma képződést és az autofagoszóma érését is fokozza ezekben az állatokban (34. ábra A és C). Az eddigi irodalmi adatok szerint az MTMR14-nek a vezikulanukleáció mellett (egyelőre nem tisztázott módon) az autofagoszóma érésben is gátló szerepe lehet¹¹⁰. Így az, hogy az AUTEN-67 a folyamat mindkét lépésére hatással van, összhangban lehet az MTMR14 eme kettős gátló szerepével. A fent leírt eredmények, illetve kutatócsoportunk más, eddig publikálatlan eredményei arra utalnak, hogy felnőtt *Drosophila* agyban az MTMR14 ortológjának, az EDTP-nek a vezikulanukleáción túl az autofagoszóma érésben is van szerepe.

A 128Q-HTT állatokban az AUTEN-67 és AUTEN-99 is fokozta az autofág aktivitást (34. és 35. ábrák és Billes 2018¹¹²). Az AUTEN-67 ezekben az állatokban is fokozza az autofagoszóma képződést, és lehetséges, hogy az érés folyamatát is (34. ábra A és C). Az AUTEN-99 hatására több Atg8a képződött, fokozódott az autofagoszóma képződés, de arányaiban nem, vagy alig változott meg az autofagoszóma érés (35. ábra A és C). Ezek alapján a két molekula nem teljesen azonos módon szabályozza az autofágia folyamatát. Ugyanakkor korai lenne még biztos következtetést levonni, mert az AUTEN-99 esetében kevés kísérleti adat áll rendelkezésünkre. Mindazonáltal elképzelhető, hogy a két molekula eltérő helyen kapcsolódik az EDTP-hez (*Drosophila* MTMR14 ortológ), és míg az AUTEN-67 gátolni tudja az EDTP mindkét szerepét, addig az AUTEN-99 csak a vezikulanukleáció gátlását akadályozza meg. Ez utóbbi akár egy olyan interakciós partner kapcsolódásának megakadályozásán is alapulhat, amely csak az autofagoszóma képződéshez kell. Mindenképpen érdemes lenne megvizsgálni továbbá, hogy az AUTEN-99 hatására valóban fokozódik-e az Atg8a-I képződése transzkripcionálisan vagy valamilyen más módon.

Mivel az autofágia és annak szabályozása is nagyfokú konzerváltságot mutat az állatvilágban, így eredményeink alapján mindkét molekula potenciális terápiás szer neurodegeneratív betegségek kezelésében, melyekkel érdemes lenne további preklinikai irányú vizsgálatokat folytatni. Mindenképp jó lenne tisztázni *Drosophila* modellen, hogy pontosan mely pontokon hat a két molekula az autofágiára, és hogy hatásuk specifikus-e. A teljes hosszúságú HTT-t kifejező HD modellek mellett érdemes lenne bevonni a vizsgálatba a csak az N-terminális

(polyQ szakaszt tartalmazó) HTT fragmentumot kifejező modelleket is, melyek jobban rekapitulálják a betegség későbbi állapotait¹⁴². Vizsgálataink egyelőre a molekuláris változásokra és a motoros tünetek javítására korlátozódtak, tényleges neurodegenerációra irányuló kutatások eddig nem történtek HD modellben^{114,144}. Az AUTEN-99 azonban egy *Drosophila* Parkinson-kór (PD) modellben képes volt megakadályozni a dopaminerg neuronok pusztulását¹¹⁴. Mindkét kismolekula citoprotektív hatású oxidatív stressz esetén egér kérgi neuron sejt kultúrákon^{113,114}.

Drosophila esetében megkönnyítette a vizsgálatot, hogy mindkét molekula a táplálékhoz hozzáadva jutott a szervezetbe. Egérben vizsgáltuk, hogy az AUTEN-99 képes-e átjutni a vér-agy gáton, és pozitív eredményeket kaptunk¹¹⁴. Ezzel ellentétben ezt nem tudtuk kimutatni AUTEN-67 esetében (nem publikált eredmények). Ugyanakkor az AUTEN-67 képes javítani Alzheimer-kóros (AD) egér modellben fészkrakó viselkedési defektusokat¹¹³. Ez alapján az AUTEN-67 vagy az AD-ben kritikus agyi oxigénellátásra lehet pozitív hatással, vagy a vér-agy gáton átjutó metabolitjai (nem publikált eredmény) fejthetnek ki kedvező hatást. Ha mindkét molekula esetén alkalmazható lenne a szájon át való bejuttatás emlősök (később ember) esetében is, az előnye lenne ezeknek a szereknek számos más terápiás eljárással szemben¹²¹.

Sokféle neurodegeneratív betegség mutat nemi különbségeket (pl. AD és PD), vagy a terápia válthat ki különböző hatást az eltérő nemekben⁸⁴. HD esetében csak mérsékelt nemi különbségeket írtak le¹⁶⁴, de például az egyik lehetséges terápiás szer, a metformin is egyes tünetekre más hatással van hím és nőstény HD modell egerekben¹⁶⁵. *Drosophila* esetében a transzgének expressziója erősebb hímekben, mint nőstényekben, így problémás egy kezelés hatásának nemi különbségeit vizsgálni egy transzgenikus HD modellben. Az eddigi egér vizsgálataink sem foglalkoztak a nemi különbségek kérdésével, de a jövőben mindenképpen hasznos lenne ilyen irányú kísérleteket elvégezni.

7. Összefoglalás

Az öregedés egy komplex biológiai jelenség, mely gyakorlatilag minden élő szervezetet érint. Az öregedés során csökken az élőlény sejtjeinek, szerveinek funkcionális és strukturális integritása és ellenállóképessége. Az idő előrehaladtával az élőlény egyre érzékenyebb a különböző környezeti hatásokra, valamint fokozatosan nő a kockázata számos betegség kialakulásának és az élőlény halálának. Egyik érdekes aspektusa az öregedési folyamatnak, hogy szinte minden állatfajnál, az embert is beleértve, különbözik a nemek élettartama. Emellett különbségek figyelhetők meg az öregedéshez kapcsolt betegségek gyakoriságában, lefolyásában és a kezelésekre adott reakciókban. Érdekes kérdés lehet, hogy az öregedési folyamat rátájában van-e különbség egy faj különböző nemei között, vagy az alapvetően jelen lévő nemi különbségek válnak hangsúlyosabbá az öregedési folyamat során. Ennek a kérdésnek egyik kiemelt vetülete az idegrendszer vizsgálata. A probléma az, hogy még mindig keveset tudunk az idegrendszerben tapasztalható ivar specifikus különbségekről. Doktori munkám során az öregedést, valamint a különböző idegrendszeri funkciókat, és ezek genetikai szabályozását vizsgáltam *Caenorhabditis elegans* és *Drosophila melanogaster* modellszervezetekben.

Kimutattam, hogy *C. elegans*-ban a szex-determinációs útvonal közvetlenül, transzkripcionálisan szabályozza az öregedési folyamat egyik legfontosabb szabályozó faktorát, a *daf-16/FOXO*-t (*d/f* izoforma), és ezzel nemi különbséget alakít ki az élettartamban. Munkánk során bizonyítottuk, hogy szex-determinációs útvonal ugyancsak közvetlenül transzkripcionálisan szabályozza az idegrendszeri funkciókat ellátó *GOA-1/Gi/o* fehérjét kódoló gént, és ezáltal alakít ki nemi különbségeket a viselkedésben. Eredményeim alapján ez a szabályozási kapcsolat embrionális korban még jelentősebb, és szerepe lehet az idegrendszer nemi identitásának kialakításában a fejlődés során. *In silico* vizsgálataink alapján ezek a szabályozási kapcsolatok emberben is jelen lehetnek.

Doktori munkám során a neurodegeneratív betegségek terápiás kezelésével is foglalkoztam *Drosophila* modellrendszerben. Két potenciális gyógyszerjelölt kismolekuláról, az AUTEN-67-ről és AUTEN-99-ről kimutattuk, hogy autofágia indukáló hatásuk van. Mindkét kismolekula csökkent a betegség tüneteit *Drosophila* Huntington-kór modell állatok agyában. Úgy tűnik mindkét molekula pozitívan hat az autofagoszóma képződés folyamatára, és az AUTEN-67 e mellett az autofagoszóma érését is pozitívan befolyásolja.

8. Summary

Aging is a very complex biological phenomenon that affects practically every living organism. The functional integrity and resistance of the cells and organs decrease with age, and the organisms become more sensitive to various environmental influences and the risk of several diseases and the death increase. An interesting aspect of aging is that the lifespan of the the two opposing sexes differs in almost all animal species, including humans. In addition, there are sex-specific differences in both the frequency and process of age-related pathologies, and in the responses for different therapies. An interesting question is that whether there is a difference in the rate of the aging process or the existing differences between the sexes become more pronounced with aging. One of the main areas of aging research concerns the age-associated deterioration of the nervous system. However, we still little know about the sex-specific differences in the nervous system. During my PhD work I studied aging and various neurological functions, and the genetic regulation of these processes in *Caenorhabditis elegans* and in *Drosophila melanogaster* model organisms.

I found that one of the main regulatory factors of the aging process, the *daf-16/FOXO* (*d/f* isoform), is modulated directly, transcriptionally by the sex-determination pathway, and this regulatory gene cascade produces sex-specific differences in lifespan in *C. elegans*. Our results also imply a direct, transcriptional affect of the sex-determination pathway on *goa-1/Gai/o* expression, which has important player in the regulation of the nervous system. This regulatory link may explain some sex-specific differences in behaviour. Based on my results, the TRA-1 – *goa-1* regulatory cascade is particularly significant at embryonic stages and may play a role in the development of the sexual identity of the nervous system. *In silico* studies suggest that this regulatory effect may present in humans as well.

During my PhD work I also examined the pathogenesis and potential treatment of neurodegenerative diseases in *Drosophila* models. We confirmed that two small molecules, AUTEN-67 and AUTEN-99, act as potential therapeutic agents for the treatment of these diseases. Both molecules enhance the autophagy flux in the brain of adult *Drosophila* animals model for Huntington's disease, and relieve the symptoms. It seems that both molecules have a positive effect on autophagosome formation, and AUTEN-67 also positively affects the maturation of autophagosomes.

9. Irodalomjegyzék

1. Corsi, A. K., Wightman, B. & Chalfie, M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook* 1–31 (2015).
2. Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71–94 (1974).
3. Altun, Z.F.; Hall, D. H. Introduction to *C. elegans* anatomy. *Introd. WormAtlas* (2009).
4. Barna, J. A sejtes stressz-választ szabályozó genetikai útvonalak integrációja *Caenorhabditis elegans*ban. (2012).
5. Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J. & Priess, J. R. *Introduction to C. elegans. C. elegans II* (1997).
6. Cassada, R. C. & Russell, R. L. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **46**, 326–42 (1975).
7. Lints, R. & Hall, D. H. Male introduction. in *WormAtlas* (2009).
8. Sulston, J. E. & Horvitz, H. R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **56**, 110–56 (1977).
9. Sulston, J. E., Albertson, D. G. & Thomson, J. N. The *Caenorhabditis elegans* male: Postembryonic development of nongonadal structures. *Dev. Biol.* **78**, 542–576 (1980).
10. Ellis, R. & Schedl, T. Sex determination in the germ line. *WormBook* 1–13 (2007).
11. *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**, 2012–8 (1998).
12. Frøkjær-Jensen, C. Exciting Prospects for Precise Engineering of *Caenorhabditis elegans* Genomes with CRISPR/Cas9. *Genetics* **195**, 635–642 (2013).
13. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
14. Thompson, O. *et al.* The million mutation project: A new approach to genetics in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res.* **23**, 1749–1762 (2013).
15. Coghlan, A. Nematode genome evolution. *WormBook*, 1-15 (2005).
16. Emmons, S. W. Male development. *WormBook*, 1-22 (2005).
17. Emmons, S. W. The development of sexual dimorphism: studies of the *C. elegans* male. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **3**, 239–262 (2014).
18. Ailion, M. & Thomas, J. H. Dauer formation induced by high temperatures in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **156**, 1047–67 (2000).
19. Gems, D. & Riddle, D. L. Genetic, Behavioral and Environmental Determinants of Male Longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **154**, 1597–610 (2000).
20. Gems, D. & Riddle, D. L. Longevity in *Caenorhabditis elegans* reduced by mating but

- not gamete production. *Nature* **379**, 723–725 (1996).
21. Hartman, P. S. & Ishii, N. Chromosome dosage as a life span determinant in *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.* **128**, 437–43 (2007).
 22. Hotzi, B. *et al.* Sex-specific regulation of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **17**, e12724 (2018).
 23. Maures, T. J. *et al.* Males shorten the life span of *C. elegans* hermaphrodites via secreted compounds. *Science*. **343**, 541–544 (2014).
 24. Shi, C., Runnels, A. M. & Murphy, C. T. Mating and male pheromone kill *Caenorhabditis* males through distinct mechanisms. *Elife* **6**, 1–26 (2017).
 25. McCulloch, D. & Gems, D. Sex-specific effects of the DAF-12 steroid receptor on aging in *Caenorhabditis elegans*. *Ann N Y Acad Sci.* **1119**, 253–9. (2007).
 26. Inoue, H. & Nishida, E. The DM domain transcription factor MAB-3 regulates male hypersensitivity to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol.* **30**, 3453–3459. (2010).
 27. Vellai, T., McCulloch, D., Gems, D. & Kovacs, A. L. Effects of Sex and Insulin/Insulin-Like Growth Factor-1 Signaling on Performance in an Associative Learning Paradigm in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **174**, 309–316 (2006).
 28. Sammut, M. *et al.* Glia-derived neurons are required for sex-specific learning in *C. Elegans*. *Nature* **526**, 385–390 (2015).
 29. Portman, D. S. Sexual modulation of sex-shared neurons and circuits in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci. Res.* **95**, 527–538 (2017).
 30. Mowrey, W. R., Bennett, J. R. & Portman, D. S. Distributed Effects of Biological Sex Define Sex-Typical Motor Behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **34**, 1579–1591 (2014).
 31. Barr, M. M., García, L. R. & Portman, D. S. Sexual dimorphism and sex differences in *caenorhabditis elegans* neuronal development and behavior. *Genetics* **208**, 909–935 (2018).
 32. Zarkower, D. Somatic sex determination. *WormBook*, 1-12 (2006).
 33. Meyer, B. J. X-Chromosome dosage compensation. *WormBook* 1–14 (2005).
 34. Starostina, N. G. *et al.* A CUL-2 Ubiquitin Ligase Containing Three FEM Proteins Degrades TRA-1 to Regulate *C. elegans* Sex Determination. *Dev. Cell* **13**, 127–139 (2007).
 35. Schvarzstein, M. & Spence, A. M. The *C. elegans* Sex-Determining GLI Protein TRA-1A Is Regulated by Sex-Specific Proteolysis. *Dev. Cell* **11**, 733–740 (2006).
 36. Hodgkin, J. A genetic analysis of the sex-determining gene, *tra-1*, in the nematode

- Caenorhabditis elegans. *Genes Dev.* **1**, 731–745 (1987).
37. Zarkower & Hodgkin, J. Molecular analysis of the C. elegans sex-determining gene tra-1: a gene encoding two zinc finger proteins. *Cell* **70**, 237–49 (1992).
 38. Zarkower & Hodgkin, J. Zinc fingers in sex determination: only one of the two C. elegans Tra-1 proteins binds DNA in vitro. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3691–8 (1993).
 39. Segal, S. P., Graves, L. E., Verheyden, J. & Goodwin, E. B. RNA-Regulated TRA-1 Nuclear Export Controls Sexual Fate. *Dev Cell.* **1**(4), 539–51. (2001).
 40. Niewiadomski, P. *et al.* Gli Proteins: Regulation in Development and Cancer. *Cells* **8**, 147 (2019).
 41. Conradt, B. & Horvitz, H. R. The TRA-1A sex determination protein of C. elegans regulates sexually dimorphic cell deaths by repressing the egl-1 cell death activator gene. *Cell* **98**, 317–27 (1999).
 42. Berkseth, M., Ikegami, K., Arur, S., Lieb, J. D. & Zarkower, D. TRA-1 ChIP-seq reveals regulators of sexual differentiation and multilevel feedback in nematode sex determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 16033–8 (2013).
 43. Yi, W., Ross, J. M. & Zarkower. Mab-3 is a direct tra-1 target gene regulating diverse aspects of C. elegans male sexual development and behavior. *Development* **127**, 4469–80 (2000).
 44. Chen & Ellis, R. E. TRA-1A regulates transcription of fog-3, which controls germ cell fate in C. elegans. *Development* **127**, 3119–29 (2000).
 45. Schwartz, H. T. & Horvitz, H. R. The C. elegans protein CEH-30 protects male-specific neurons from apoptosis independently of the Bcl-2 homolog CED-9. *Genes Dev.* **21**, 3181–94 (2007).
 46. Mason, D. A., Rabinowitz, J. S. & Portman, D. S. dmd-3, a doublesex-related gene regulated by tra-1, governs sex-specific morphogenesis in C. elegans. *Development* **135**, 2373–2382 (2008).
 47. Szabó, E. *et al.* TRA-1/GLI controls the expression of the Hox gene lin-39 during C. elegans vulval development. *Dev. Biol.* **330**, 339–48 (2009).
 48. Hargitai, B. *et al.* xol-1, the master sex-switch gene in C. elegans, is a transcriptional target of the terminal sex-determining factor TRA-1. *Development* **136**, 3881–7 (2009).
 49. Weinberg, P., Berkseth, M., Zarkower, D. & Hobert, O. Sexually Dimorphic unc-6/Netrin Expression Controls Sex-Specific Maintenance of Synaptic Connectivity. *Current biology CB* **28**, 623–629 e623 (2018)
 50. Serrano-Saiz, E., Oren-Suissa, M., Bayer, E. A. & Hobert, O. Sexually dimorphic differentiation of a C. elegans hub neuron is cell-autonomously controlled by a

- conserved transcription factor. *Curr. Biol.* **27**, 199–209 (2017).
51. Hargitai, B. A *C. elegans* TRA-1/GLI/Ci szex-determinációs faktor célgénjeinek meghatározása és analízise. (2009).
 52. Murphy, C. T. & Hu, P. J. Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*. *WormBook* 1–43 (2013).
 53. Bastiani, C. Heterotrimeric G proteins in *C. elegans*. *WormBook* 1–25 (2006).
 54. Kutnyánszky, V. *et al.* Sex-specific regulation of neuronal functions in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Genet. genomics* **under rev**, (2019).
 55. Amrit, F. R. G. & May, R. C. Younger for longer: insulin signalling, immunity and ageing. *Curr. Aging Sci.* **3**, 166–76 (2010).
 56. Kenyon, C. J. The genetics of ageing. *Nature* **464**(7288), 504–12 (2010).
 57. Shore, D. E. & Ruvkun, G. A cytoprotective perspective on longevity regulation. *Trends Cell Biol.* **23**, 409–20 (2013).
 58. Kirkwood, T. B. L. Understanding the odd science of aging. *Cell* **120**, 437–447 (2005).
 59. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **153**(6), 1194–217 (2013).
 60. Tower, J. Sex-Specific Gene Expression and Life Span Regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* **28**, 735–747 (2017).
 61. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L. & Serrano, M. The Hallmarks of Aging. **153**, 1194–1217 (2013).
 62. Talens, R. P. *et al.* Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell* **11**, 694–703 (2012).
 63. Sturm, Á., Ivics, Z. & Vellai, T. The mechanism of ageing: primary role of transposable elements in genome disintegration. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 1839–47 (2015).
 64. Kyriakakis, E., Princz, A. & Tavernarakis, N. Stress Responses During Ageing: Molecular Pathways Regulating Protein Homeostasis. *Methods Mol Biol.* **1292**, 215–234 (2015).
 65. Calderwood, S. K., Murshid, A. & Prince, T. The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging--a mini-review. *Gerontology* **55**, 550–8 (2009).
 66. Tomaru, U. *et al.* Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am. J. Pathol.* **180**, 963–72 (2012).
 67. Rubinsztein, D. C., Mariño, G. & Kroemer, G. Autophagy and Aging. *Cell* **146**, 682–

- 695 (2011).
68. Vellai, T. *et al.* Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* **426**, 620 (2003).
 69. Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A. & Tabtiang, R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366**, 461–464 (1993).
 70. Li, Y.-H. & Zhang, G.-G. Towards understanding the lifespan extension by reduced insulin signaling: bioinformatics analysis of DAF-16/FOXO direct targets in *Caenorhabditis elegans*. *Oncotarget* **7**, 19185–92 (2016).
 71. Schuster, E. *et al.* DamID in *C. elegans* reveals longevity-associated targets of DAF-16/FoxO. *Mol. Syst. Biol.* **6**, 399 (2010).
 72. Tullet, J. M. A. DAF-16 target identification in *C. elegans*: past, present and future. *Biogerontology* **16**, 221–34 (2015).
 73. Murphy, C. T. The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: approaches and discoveries. *Exp. Gerontol.* **41**, 910–21 (2006).
 74. Mukhopadhyay, A., Oh, S. W. & Tissenbaum, H. A. Worming pathways to and from DAF-16/FOXO. *Exp. Gerontol.* **41**, 928–34 (2006).
 75. Oh, S. W. *et al.* Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *Nat. Genet.* **38**, 251–7 (2006).
 76. Murphy, C. T. *et al.* Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424**, 277–83 (2003).
 77. Lee, S. S., Kennedy, S., Tolonen, A. C. & Ruvkun, G. DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism. *Science* **300**, 644–7 (2003).
 78. Sun, X., Chen, W.-D. & Wang, Y.-D. DAF-16/FOXO Transcription Factor in Aging and Longevity. *Front. Pharmacol.* **8**, 548 (2017).
 79. Bansal, A. *et al.* Transcriptional regulation of *Caenorhabditis elegans* FOXO/DAF-16 modulates lifespan. *Longev. Heal.* **3**, 5 (2014).
 80. Chen, A. T.-Y. *et al.* Longevity Genes Revealed by Integrative Analysis of Isoform-Specific *daf-16*/FoxO Mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **201**, 613–29 (2015).
 81. Kwon, E.-S., Narasimhan, S. D., Yen, K. & Tissenbaum, H. a. A new DAF-16 isoform regulates longevity. *Nature* **466**, 498–502 (2010).
 82. Libina, N., Berman, J. R. & Kenyon, C. Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell* **115**, 489–502 (2003).
 83. Regan, J. C. & Partridge, L. Gender and longevity: Why do men die earlier than

- women? Comparative and experimental evidence. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**, 467–479 (2013).
84. Austad, S. N. & Fischer, K. E. Sex Differences in Lifespan. *Cell Metab.* **23**, 1022–1033 (2016).
 85. Balaton, B. P. & Brown, C. J. Escape Artists of the X Chromosome. *Trends Genet.* **32**, 348–359 (2016).
 86. Johnson, T. E. & Wood, W. B. Genetic analysis of life-span in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS* **79**, 6603–7 (1982).
 87. Johnson, T. E. & Hutchinson, E. W. Absence of strong heterosis for life span and other life history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **134**, 465–74 (1993).
 88. McCulloch, D. & Gems, D. Evolution of male longevity bias in nematodes. *Aging Cell* **2**, 165–173 (2003).
 89. Koubova, J. & Guarente, L. How does calorie restriction work? *Genes Dev.* **17**, 313–321 (2003).
 90. Koelle, M. R. Neurotransmitter signaling through heterotrimeric G proteins: insights from studies in *C. elegans*. *WormBook* 1–78 (2016).
 91. Lochrie, M. A., Mendel, J. E., Sternberg, P. W. & Simon, M. I. Homologous and unique G protein α subunits in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell Regul.* **2**, 135–154 (1991).
 92. Mendel, J. E. *et al.* Participation of the protein Go in multiple aspects of behavior in *C. elegans*. *Science* **267**, 1652–5 (1995).
 93. Sassa, T. & Maruyama, I. N. A G-protein α subunit, GOA-1, plays a role in *C. elegans* avoidance behavior of strongly alkaline pH. *Commun Integr Biol.* **6**(6), e26668. (2013).
 94. He, C. & O'Halloran, D. M. Nuclear PKG localization is regulated by Goalpha and is necessary in the AWB neurons to mediate avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci. Lett.* **553**, 35–39 (2013).
 95. Matsuki, M., Kunitomo, H. & Iino, Y. Goalpha regulates olfactory adaptation by antagonizing Gqalpha-DAG signaling in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS* **103**, 1112–7 (2006).
 96. Lipton, J., Kleemann, G., Ghosh, R., Lints, R. & Emmons, S. W. Mate searching in *Caenorhabditis elegans*: a genetic model for sex drive in a simple invertebrate. *J. Neurosci.* **24**, 7427–34 (2004).
 97. Hardaker, L. A., Singer, E., Kerr, R., Zhou, G. & Schafer, W. R. Serotonin modulates locomotory behavior and coordinates egg-laying and movement in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurobiol.* **49**, 303–13 (2001).

98. Hagan, O., Hart, M. P. & Hobert, O. Sexual Dimorphism : Mystery Neurons Control Sex-Specific Behavioral Plasticity. *Curr. Biol.* **25**, R1170–R1172 (2015).
99. Fagan, K. A. & Portman, D. S. Sexual modulation of neural circuits and behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Semin. Cell Dev. Biol.* **33**, 3–9 (2014).
100. Ryan, D. A. *et al.* Sex, Age, and Hunger Regulate Behavioral Prioritization through Dynamic Modulation of Chemoreceptor Expression. *Curr. Biol.* **24**, 2509–2517 (2014).
101. White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N. & Brenner, S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **314**, 1–340 (1986).
102. Jarrell, T. A. *et al.* The connectome of a decision-making neural network. *Science* **337**, 437–44 (2012).
103. Oren-Suissa, M., Bayer, E. A. & Hobert, O. Article Sex-specific pruning of neuronal synapses in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **533**, 206–211 (2016).
104. Mulakkal, N. C. *et al.* Autophagy in drosophila: From historical studies to current knowledge. *Biomed Res. Int.* **2014**, 273473 (2014).
105. Wyss-Coray, T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature* **539**, 180–186 (2016).
106. Tan, C. C. *et al.* Autophagy in aging and neurodegenerative diseases: Implications for pathogenesis and therapy. *Neurobiol. Aging* **35**, 941–957 (2014).
107. Menzies, F. M. *et al.* Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* **93**, 1015–1034 (2017).
108. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728–741 (2011).
109. Ariosa, A. R. & Klionsky, D. J. Autophagy core machinery: overcoming spatial barriers in neurons. *J. Mol. Med.* **94**, 1217–1227 (2016).
110. Vergne, I., Roberts, E., Elmaoued, R. A., Laporte, J. & Deretic, V. Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase jumpy. *EMBO J.* **28**, 2244–2258 (2009).
111. Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* **36**, 1811–1836 (2017).
112. Billes, V. Két autofágia aktiváló kismolekula, az AUTEN-67 és az AUTEN-99 hatásának vizsgálata *Drosophila melanogaster* Huntington-kór modellben. (2017).
113. Papp, D. *et al.* AUTEN-67, an autophagy-enhancing drug candidate with potent antiaging and neuroprotective effects. *Autophagy* **12**, 273–286 (2016).
114. Kovács, T. *et al.* The small molecule AUTEN-99 (autophagy enhancer-99) prevents the

- progression of neurodegenerative symptoms. *Scientific reports* **7**, 42014 (2017).
115. McGurk, L., Berson, A. & Bonini, N. M. Drosophila as an in vivo model for human neurodegenerative disease. *Genetics* **201**, 377–402 (2015).
 116. Hales, K. G., Korey, C. A., Larracuente, A. M. & Roberts, D. M. Genetics on the Fly: A Primer on the Drosophila Model System. *Genetics* **201**, 815–42 (2015).
 117. Piper, M. D. W. & Partridge, L. Drosophila as a model for ageing. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1864**, 2707–2717 (2018).
 118. Adams, M. D. *et al.* The genome sequence of Drosophila melanogaster. *Science* **287**, 2185–95 (2000).
 119. Marsh & Thompson, L. M. Drosophila in the Study of Neurodegenerative Disease. *Neuron* **52**, 169–178 (2006).
 120. Rüb, U. *et al.* Huntington's disease (HD): the neuropathology of a multisystem neurodegenerative disorder of the human brain. *Brain Pathol.* **26**, 726–740 (2016).
 121. Wyant, K. J., Ridder, A. J. & Dayalu, P. Huntington's Disease-Update on Treatments. *Current neurology and neuroscience reports* **17**, 33 (2017).
 122. Saudou, F. & Humbert, S. The Biology of Huntingtin. *Neuron* **89**, 910–926 (2016).
 123. Rui, Y.-N. *et al.* Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* **17**, 262–275 (2015).
 124. Krench, M.; J. T. L. Neurotoxicity Pathways in Drosophila Models of the Polyglutamine Disorders. *Curr. Top. Dev. Biol.* **121**, 201–223 (2017).
 125. Marsh, J. L., Pallos, J. & Thompson, L. M. Fly models of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* **12**, R187–R193 (2003).
 126. Kutnyánszky, V. Doktori értekezés-folyamatban. (2019).
 127. Sulston, J. & Hodgkin, J. Methods. In The nematode C. elegans *Cold Spring Harbor Laboratory Press* pp v 587-606. (1988)
 128. Stiernagle, T. Maintenance of C. elegans. *WormBook*, 1–11 (2006).
 129. Evans, T. C. Transformation and microinjection *. *WormBook* (2006).
 130. Abramoff, M. D. ., Magalhaes, P. J. . & Ram, S. J. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* **11**, 36–42 (2004).
 131. Hoogewijs, D., Houthoofd, K., Matthijssens, F., Vandesompele, J. & Vanfleteren, J. R. Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in C. elegans. *BMC Mol. Biol.* **9**, 9 (2008).
 132. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
 133. Ratajewski, M. *et al.* ABCC6 Expression Is Regulated by CCAAT/Enhancer-Binding

- Protein Activating a Primate-Specific Sequence Located in the First Intron of the Gene. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 2709–2717 (2012).
134. Arányi, T., Váradi, A., Simon, I. & Tusnády, G. E. The BiSearch web server. *BMC Bioinformatics* **7**, 431 (2006).
 135. Pircs, K. *et al.* Advantages and limitations of different p62-based assays for estimating autophagic activity in Drosophila. *PLoS One* **7**, e44214 (2012).
 136. Takáts, S. *et al.* Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in Drosophila. *J. Cell Biol.* **201**, 531–9 (2013).
 137. Morran, L. T., Cappy, B. J., Anderson, J. L. & Phillips, P. C. Sexual partners for the stressed: facultative outcrossing in the self-fertilizing nematode *Caenorhabditis elegans*. *Evolution* **63**, 1473–82 (2009).
 138. Angeli, S. *et al.* A DNA synthesis inhibitor is protective against proteotoxic stressors via modulation of fertility pathways in *Caenorhabditis elegans*. *Aging (Albany, NY)*. **5**, 759–69 (2013).
 139. Martins, R., Lithgow, G. J. & Link, W. Long live FOXO: Unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell* **15**, 196–207 (2016).
 140. Stergachis, A. B. *et al.* Exonic transcription factor binding directs codon choice and affects protein evolution. *Science* **342**, 1367–72 (2013).
 141. Peden, E. M. & Barr, M. M. The KLP-6 kinesin is required for male mating behaviors and polycystin localization in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **15**, 394–404 (2005).
 142. Romero, E. *et al.* Suppression of neurodegeneration and increased neurotransmission caused by expanded full-length huntingtin accumulating in the cytoplasm. *Neuron* **57**, 27–40
 143. Torroja, L., Chu, H., Kotovsky, I. & White, K. Neuronal overexpression of APPL, the Drosophila homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr. Biol.* **9**, 489–92 (1999).
 144. Billes, V. *et al.* AUTEN-67 (Autophagy Enhancer-67) Hampers the Progression of Neurodegenerative Symptoms in a Drosophila model of Huntington’s Disease. *J. Huntingtons. Dis.* **5**, 133–147 (2016).
 145. Kovács, T. MTMR14-gátló kismolekulák (AUTEN-67 és AUTEN-99) autofágiára gyakorolt hatásának vizsgálata *Drosophila melanogaster*ben. (2017).
 146. Mizushima, N. & Yoshimori, T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542–5 (2007).
 147. Martin, D. D. O., Ladha, S., Ehrnhoefer, D. E. & Hayden, M. R. Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. *Trends Neurosci.* **38**, 26–35 (2015).

148. Hui, C. & Angers, S. Gli Proteins in Development and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 513–537 (2011).
149. Riedel, C. G. *et al.* DAF-16 employs the chromatin remodeller SWI/SNF to promote stress resistance and longevity. *Nat. Cell Biol.* **15**, 491–501 (2013).
150. White, J. Q. & Jorgensen, E. M. Sensation in a single neuron pair represses male behavior in hermaphrodites. *Neuron*. **75**(4), 593–600 (2012).
151. White, J. Q. *et al.* The sensory circuitry for sexual attraction in *C. elegans* males. *Curr. Biol.* **17**, 1847–57 (2007).
152. Hilbert, Z. A. & Kim, D. H. Sexually dimorphic control of gene expression in sensory neurons regulates decision-making behavior in *C. elegans*. *Elife* **6**, e21166. (2017).
153. Nolan, K. M., Sarafi-Reinach, T. R., Horne, J. G., Saffer, A. M. & Sengupta, P. The DAF-7 TGF-signaling pathway regulates chemosensory receptor gene expression in *C. elegans*. *Genes Dev.* **16**(23), 3061–73 (2002).
154. Myers, E. M. *Ga o* and *Ga q* Regulate the Expression of *daf-7*, a TGFb-like Gene, in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* **7**, 40368 (2012).
155. Hilbert, Z. A. & Kim, D. H. PDF-1 neuropeptide signaling regulates sexually dimorphic gene expression in shared sensory neurons of *C. elegans*. *Elife*, **7**, e36547 (2018).
156. Burglin, T. & Kuwabara, P. E. Homologs of the Hh signalling network in *C. elegans*. *WormBook*, **28**, 1–14 (2006).
157. Franco, H. L. & Yao, H. H.-C. Sex and hedgehog: roles of genes in the hedgehog signaling pathway in mammalian sexual differentiation. *Chromosome Res.* **20**, 247–58 (2012).
158. Gilder, A. S., Chen, Y.-B., Jackson, R. J., Jiang, J. & Maher, J. F. Fem1b promotes ubiquitylation and suppresses transcriptional activity of Gli1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **440**, 431–6 (2013).
159. Lipinski, R. J. *et al.* Sonic hedgehog signaling regulates the expression of insulin-like growth factor binding protein-6 during fetal prostate development. *Dev. Dyn.* **233**, 829–836 (2005).
160. Zhang, X., Cheng, Q., Wang, Y., Leung, P. S. & Mak, K. K. Hedgehog signaling in bone regulates whole-body energy metabolism through a bone–adipose endocrine relay mediated by PTHrP and adiponectin. *Cell Death Differ.* **24**, 225–237 (2017).
161. Pitetti, J.-L. *et al.* Insulin and IGF1 Receptors Are Essential for XX and XY Gonadal Differentiation and Adrenal Development in Mice. *PLoS Genet.* **9**, e1003160 (2013).
162. Feng, H., Khalil, S., Neubig, R. R. & Sidiropoulos, C. A mechanistic review on

- GNAO1-associated movement disorder. *Neurobiol. Dis.* **116**, 131–141 (2018).
163. Davis, E. J., Lobach, I. & Dubal, D. B. Female XX sex chromosomes increase survival and extend lifespan in aging mice. *Aging cell* **18**, e12871 (2019).164. Smith, K. M. & Dahodwala, N. Sex differences in Parkinson's disease and other movement disorders. *Exp. Neurol.* **259**, 44–56. (2014).
165. Ma, T. C. *et al.* Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurosci. Lett.* **411**, 98–103 (2007).

10. Függelék

F1. Táblázat. Élettartam adatok hermafroditákban (herm.) és hímekben

Genotípus	Állat-szám	Ismétlések száma	Átlagos élettartam(nap)	±S.E.M. (nap)	LogRank teszt- P érték (Bonferroni korrekcióval)	Független t-teszt- P érték (Bonferroni korrekcióval)
19. A ábra						
<i>vad típusú herm.</i>	526	9	11,70	0,06		
<i>vad típusú hím</i>	148	9	10,16	0,15	vs. <i>vad típusú herm.</i> P < 0,0001	vs. <i>vad típusú herm.</i> P < 0,0001
19. C ábra						
<i>vad típusú herm.</i> (20°C)	182	4	15,25	0,23		
<i>vad típusú hím</i> (20°C)	31	4	12,65	0,41	vs. <i>vad típusú herm.</i> (20°C) P < 0,0001	vs. <i>vad típusú herm.</i> (20°C) P < 0,0001
19. B ábra						
<i>vad típusú herm</i> (FUDR nélkül)	675	15	9,15	0,15		
<i>vad típusú hím</i> (FudR nélkül)	75	15	7,8	0,2	vs. <i>vad típusú herm.</i> (FUDR nélkül) P < 0,0001	vs. <i>vad típusú herm.</i> (FUDR nélkül) P < 0,0001
20. A ábra						
<i>daf-2(e1370) herm.</i>	432	7	24,56	0,15		
<i>daf-2(e1370) hím</i>	170	7	21,62	0,21	vs. <i>daf-2(e1370) herm.</i> P < 0,0001	vs. <i>daf-2(e1370) herm.</i> P < 0,0001
<i>daf-2(e1370); daf-16(mu86) herm.</i>	500	8	8,29	0,07	vs. <i>daf-2(e1370) herm.</i> P < 0,0001	vs. <i>daf-2(e1370) herm.</i> P < 0,0001
<i>daf-2(e1370); daf-16(mu86) hím</i>	138	8	8,06	0,11	vs. <i>daf-2(e1370); daf-16(mu86) herm.</i> P = 0,0996	vs. <i>daf-2(e1370); daf-16(mu86) herm.</i> P = 0,4329
20. B ábra						
<i>daf-2(e1370) herm.</i>	366	5	25,00	0,19		
<i>daf-2(e1370) hím</i>	74	5	22,41	0,52	vs. <i>daf-2(e1370) herm.</i> P < 0,0001	vs. <i>vad típus herm.</i> P < 0,0001
<i>daf-2(e1370); daf-16(mgDf50)</i>	290	4	9,37	0,09	vs. <i>daf-2(e1370) herm.</i> P <	vs. <i>vad típus herm.</i>

herm.					0,0001	P < 0,0001
daf-2(e1370); daf-16(mgDf50) him	71	4	9,37	0,17	vs. daf- 2(e1370); daf-16(mgDf50) herm. P = 0,827	vs. daf- 2(e1370); daf-16(mgDf50) herm. P = 5,9332
21.ábra						
vad típus	118	2	11,31	0,10		
tra-1(e1099)	98	2	8,76	0,22	vs. vad típus P < 0,0001	vs. vad típus P < 0,0001
tra-1(e1488)	71	2	8,03	0,20	vs. vad típus P < 0,0001	vs. vad típus P < 0,0001
fem-3(e2006)	148	2	12,39	0,20	vs. vad típus P < 0,0001	vs. vad típus P < 0,0001
tra-3(e1767)	102	2	7,17	0,17		
tra-1(e1575gf)/+; tra-3(e1767)	96	2	10,93	0,28	vs. tra-3(e1767) P < 0,0001	vs. tra-3(e1767) P < 0,0001
22. A ábra						
vad típus	145	2	12,73	0,15		
daf-16(mu86)	110	2	10,63	0,12	vs. vad típus P < 0,0001	vs. vad típus P < 0,0001
fem-3(e2006)	129	2	15,05	0,31	vs. vad típus P < 0,0001	vs. vad típus P < 0,0001
fem-3(e2006); daf-16(mu86)	105	2	10,54	0,16	vs. daf- 16(mu86) P = 4,6577	vs. daf- 16(mu86) P = 4,0016
					vs. fem- 3(e2006) P < 0,0001	vs. fem- 3(e2006) P < 0,0001
22. B ábra						
vad típus (ev)	104	2	12,35	0,19		
daf-16(RNSi)	44	2	9,41	0,22	vs. vad típus (ev) P < 0,0001	vs. vad típus (ev) P < 0,0001
fem-3(e2006) (ev)	151	2	13,58	0,24	vs. vad típus (ev) P < 0,0001	vs. vad típus (ev) P = 0,0025
fem-3(e2006); daf-16(RNSi)	109	2	8,83	0,12	vs. daf-16(RNSi) P = 0,0583	vs. daf- 16(RNSi) P = 0,0903
					vs. fem- 3(e2006) (ev) P < 0,0001	vs. fem- 3(e2006) (ev) P < 0,0001
22. C ábra						
daf-16(mu86)	131	2	9,50	0,07		
tra-3(e1767)	161	3	7,70	0,14		
tra-1(e1575)/+; tra-3(e1767)	137	3	11,20	0,20	vs. daf- 16(mu86)	vs. daf- 16(mu86)

					P < 0,0001	P < 0,0001
					vs. <i>tra-3(e1767)</i> P < 0,0001	vs. <i>tra-3(e1767)</i> P < 0,0001
<i>tra-1(e1575)/+;</i> <i>tra-3(e1767);</i> <i>daf-16(mu86)</i>	137	3	7,00	0,07	vs. <i>tra-3(e1767)</i> P < 0,0001	vs. <i>tra-3(e1767)</i> P < 0,0001
					vs. <i>tra-1(e1575)/+;</i> <i>tra-3(e1767)</i> P < 0,0001	vs. <i>tra-1(e1575)/+;</i> <i>tra-3(e1767)</i> P < 0,0001
22. D ábra						
<i>daf-16(RNSi)</i>	42	2	9,40	0,22		
<i>tra-3(e1767) (ev)</i>	83	2	7,69	0,20		
<i>tra-1(e1575)/+;</i> <i>tra-3(e1767) (ev)</i>	88	2	10,51	0,24	vs. <i>daf-16(RNSi)</i> P = 0,0002	vs. <i>daf-16(RNSi)</i> P = 0,0282
					vs. <i>tra-3(e1767) (ev)</i> P < 0,0001	vs. <i>tra-3(e1767) (ev)</i> P < 0,0001
<i>tra-1(e1575)/+;</i> <i>tra-3(e1767);</i> <i>daf-16(RNSi)</i>	35	2	8,80	0,27	vs. <i>tra-3(e1767) (ev)</i> P = 0,0654	vs. <i>tra-3(e1767) (ev)</i> P = 0,0112
					vs. <i>tra-1(e1575)/+;</i> <i>tra-3(e1767) (ev)</i> P < 0,0001	vs. <i>tra-1(e1575)/+;</i> <i>tra-3(e1767) (ev)</i> P < 0,0001
27. C. ábra						
<i>vad típus him</i> (60 herms. : 10 him)	75	7	10,13	0,21		
<i>daf-16(mgDf50) him</i> (60 herms. : 10 him)	102	8	7,61	0,1	vs. <i>vad típus him</i> P < 0,0001	vs. <i>vad típus him</i> P < 0,0001
<i>daf-16(mgDf50); Ip1s14 (daf-16d/f::gfp) him</i> (60 herms. : 10 him)	65	6	10,65	0,24	vs. <i>vad típus him</i> P = 0,408 vs. <i>daf-16(mgDf50) him</i> P < 0,0001	vs. <i>vad típus him</i> P = 0,325 vs. <i>daf-16(mgDf50) him</i> P < 0,0001
27. B ábra						
<i>vad típus herm.</i> (60 herms. : 10 him)	410	7	12,2	0,11		
<i>daf-16(mgDf50) herm.</i>	568	8	9,16	0,05	vs. <i>vad típus herm.</i>	vs. <i>vad típus herm.</i>

(60 herms. : 10 hím)					P < 0,0001	P < 0,0001
<i>daf-16(mgDf50); Ip1s14</i> (<i>daf-16d/f::gfp</i>) herm. (60 herms. : 10 hím)	302	6	13,68	0,1	vs. <i>vad</i> típus herm. P < 0,0001 vs. <i>daf-16(mgDf50)</i> herm. P < 0,0001	vs. <i>vad</i> típus herm. P < 0,0001 vs. <i>daf-16(mgDf50)</i> herm. P < 0,0001

F2. táblázat. Western Blot adatok ev: empty vector kontroll: üres vektor) (23. ábra).

Genotípus	Relatív fehérjeszint
vad-típus	1,000
<i>tra-1(e1099)</i>	0,000
<i>tra-1(e1099)</i>	0,000
<i>fem-3(e2006)</i>	40,651
RNSi kontroll (ev)	1,000
<i>tra-1ab</i> RNSi	0,806

F3. táblázat. ChIP adatok. “Ab”: antitest (antibody), Vellai lab: Vellai laborban készült antitest, S.C.B.: Santa Cruz Biotechnology (kereskedelmi forgalomban kapható antitest).

Antitest	% input	±S.D.	% input	±S.D.	Független t-teszt P érték <i>daf-11</i> vs. célgén
24. A ábra					
	<i>daf-11</i>		<i>xol-1</i>		
<i>egér IgG</i>	0,510	0,014	0,485	0,227	0,889
<i>TRA-1 Ab</i> (Vellai lab.)	0,754	0,068	1,730	0,028	0,003
<i>TRA-1 Ab</i> (S.C.B.)	0,148	0,031	0,931	0,013	0,001
24. B ábra					
	<i>daf-11</i>		<i>daf-16d/f</i>		
<i>egér IgG</i>	0,354	0,041	0,348	0,037	0,902
<i>TRA-1 Ab</i> (Vellai lab.)	0,501	0,145	0,875	0,055	0,026
<i>TRA-1 Ab</i> (S.C.B.)	0,380	0,064	0,888	0,033	0,002

F4. táblázat. *daf-16*-os qRT-PCR adatok. herm.: hermafrodita.

Izoforma	Genetikai háttér	Átlagos relatív mRNS szint	±S.D.	Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Teszt P érték vs. kontroll
<i>daf-16d/f</i>	25. A ábra			
	XX herm.	1,000	0,161	kontroll
	XO hím	0,531	0,149	0,020
	<i>tra-1(1099)</i> XX hím	0,535	0,133	0,018

	<i>tra-1(e1488)</i> XX hím	0,768	0,212	0,205
25. B ábra				
	<i>tra-1(e1575)/+;tra-3(e1767)</i>	1,000	kontroll	kontroll
	<i>tra-3(e1767)</i>	0,663	0,133	0,032

F5. táblázat. *daf-16*-os reporter konstrukciók expressziós elemzésének adatai.

Transzgén	Genetikai háttér	Állatszám	Átlagos relatív expressziós szint	±S.E.M.	Független <i>t</i> -teszt P érték vs. kontroll
26. A' ábra					
<i>daf-16d/f::gfp</i> (fiatal felnőtt)	XX herm.	250	1,000	0,014	
	XO hím	43	0,664	0,020	vs. herm. P < 0,0001
	<i>tra-1(e1099)</i>	97	0,758	0,027	vs. herm. P < 0,0001 vs. hím P = 0,056
	<i>tra-1(e1488)</i>	206	0,639	0,014	vs. herm. P < 0,0001 vs. hím P = 3,047
	<i>fem-3(e2006)</i>	46	1,182	0,042	vs. herm. P < 0,0001
26. A'' ábra					
<i>mutaf-16d/f::gfp</i> (fiatal felnőtt)	XX herm.	233	1,000	0,011	
	XO hím	9	1,029	0,052	vs. herm. P = 3,841
	<i>tra-1(e1099)</i>	71	0,998	0,019	vs. herm. P = 5,594 vs. hím P = 0,186
	<i>tra-1(e1488)</i>	75	0,970	0,018	vs. herm. P = 0,838 vs. hím P = 2,190
	<i>fem-3(e2006)</i>	31	1,030	0,024	vs. herm. P = 1,928
26. B' ábra					
<i>daf-16d/f::gfp</i> idős (6 napos) felnőtt	<i>him-5(e1490)</i> herm.	66	1,000	0,036	vs. <i>him-5(e1490)</i> herm. P < 0,0001
	<i>him-5(e1490)</i> hím	62	0,767	0,026	vs. <i>him-5(e1490)</i> herm. P = 0,007 vs. <i>him-5(e1490)</i> hím P = 6,056
	<i>tra-1(e1099)</i>	69	0,846	0,037	vs. <i>him-5(e1490)</i> herm. P = 0,007 vs. <i>him-5(e1490)</i>

					hím P = 6,056
	<i>tra-1(e1488)</i>	66	1,179	0,053	vs. <i>him-5(e1490)</i> herm. P = 0,205 vs. <i>him-5(e1490)</i> hím P < 0,0001
27. A' ábra					
<i>daf-16d/f::gfp</i> (<i>lpIs14</i>) (<i>fiatal felnőtt</i>)	XX herm.	16	1,000	0,026	
	XO hím	14	0,694	0,035	0,0001

F6. táblázat. „Erős” és „gyenge” expressziót mutató embriók %-os aránya a *goa-1*-es riporter konstrukciók esetén (30. B-D ábra).

<i>GOA-1::GFP</i>	Embriók száma	„erős” expressziót mutató embriók száma	% „erős” expressziót mutató embriók	±SD
vad típus	125	1	0,80%	1,09%
<i>him-5(e1490)</i>	32	9	28,13%	1,94%
<i>tra-1(e1099)/+</i>	80	15	18,75%	1,57%
<i>fem-3(e2006)</i>	65	1	1,54%	2,08%
<i>mutGOA-1::GFP</i>	Embriók száma	„erős” expressziót mutató embriók száma	% „erős” expressziót mutató embriók	±SD
vad típus	56	0	0,00%	0,00%
<i>him-5(e1490)</i>	42	2	4,79%	1,54%
<i>tra-1(e1099)/+</i>	36	0	0,00%	0,00%
<i>fem-3(e2006)</i>	43	0	0,00%	0,00%

F7. táblázat. „Erős” és „gyenge” expressziót mutató embriók expressziós elemzése a *goa-1*-es riporter konstrukciók esetén (30. B, C és E ábra)

<i>GOA-1::GFP</i> embriókban	„gyenge” expressziót mutató embriók		„erős” expressziót mutató embriók		Kruskal-Wallis H teszt Dunn's Post Hoc Teszt-el P érték
	Átlagos relatív expressziós szint	±SEM	Átlagos relatív expressziós szint	±SEM	
vad típus	1,123	0,049	4,915	-	
<i>him-5(e1490)</i>	1,000	0,085	5,752	0,399	„erős” vs. „gyenge” embriók P<0,000
<i>tra-1(e1099)/+</i>	0,961	0,11	5,354	0,179	„erős” vs. „gyenge” embriók,

					P<0,000
<i>fem-3(e2006)</i>	0,54	0,028	6,06	-	vs. vad típus, P<0,000
mutGOA::GFP embriókban	„gyenge” expressziót mutató embriók		„erős” expressziót mutató embriók		Kruskal-Wallis H teszt Dunn’s Post Hoc Teszt-el P érték
	Átlagos relatív expressziós szint	±SEM	Átlagos relatív expresszió s szint	±SEM	
vad típus	0,470	0,034	-	-	
<i>him-5(e1490)</i>	1,175	0,104	3,583	0,001	halvány vs. fényes embriók, P=0,002
<i>tra-1(e1099)/+</i>	0,317	0,035	-	-	-
<i>fem-3(e2006)</i>	0,389	0,032	-	-	vs. vad típus, P=0,148

F8. táblázat. *goa-1*-es szemi-qPCR adatok (31. ábra).

Gén	Stádium	Genetikai háttér	Relatív mRNS szint	±SD
<i>goa-1</i>	embrió	vad-típus	1,000	0,000
		vad-típus hím (50%)	1,546	0,562
		<i>him-5(e1490)</i>	1,850	0,912
		<i>him-8(1490)</i>	1,316	0,707
		vad-típus	1,000	0,000
		<i>tra-1(e1099)</i>	1,365	0,719

F9. táblázat, PKD-2::GFP expressziós elemzése hímekben (32. ábra).

<i>PKD-2::GFP (bxIS14)</i>		Állatszám	Átlagos relatív expressziós szint	±SEM	Kruskal-Wallis H teszt Dunn’s Post Hoc Teszt-el és Bonferroni korrekcióval P érték
farki régió	<i>him-5(e1490)</i> XO hím	19	1,000	0,064	kontroll
	<i>goa-1(sa734);him-5(e1490)</i> XO hím	16	0,236	0,064	vs. kontroll P<0,0001
	<i>goa-1(syIS9gf);him-5(e1490)</i> XO hím	15	1,971	0,329	vs. kontroll P=0,390
feji régió	<i>him-5(e1490)</i> XO hím	12	1,000	0,102	kontroll
	<i>goa-1(sa734);him-5(e1490)</i> XO hím	16	0,326	0,058	vs. kontroll P=0,001
	<i>goa-1(syIS9gf);him-5(e1490)</i> XO hím	10	1,116	0,232	vs. kontroll P=0,246

F10. táblázat. PKD-2::GFP(bxIs14) expressziós elemzése hermafroditákban (33. ábra).

Genotípus	Ismétlések száma	Ektopikus expressziót mutató állatok száma	Állatszám	Ektopikus expressziót mutató állatok aránya	Független mintásMann-Whitney U Teszt – P érték
<i>him-5(e1490)</i> XX herm.	3	1	815	0,001	
<i>goa-1(syIS9gf);him-5(e1490)</i> XX herm	3	12	1176	0,010	0,700

F11. táblázat. Az AUTEN-67 kismolekula hatásának vizsgálata *Drosophila* HD modellben (34. ábra). A relatív p62-es fehérjeszintek nem vethetők össze a relatív Atg8a-s fehérjeszintekkel.

Genotípus-Kezelés	Ismétlések száma	p62		Atg8a-I		Atg8a-II	
		Átlagos relatív fehérjeszint	±SEM	Átlagos relatív fehérjeszint	±SEM	Átlagos relatív fehérjeszint	±SEM
16Q-HTT (DMSO)	2	1,000		1,000		0,596	0,161
16Q-HTT (AUTEN-67)	2	0,807	0,076	0,555	0,224	0,130	0,130
128Q-HTT (DMSO)	2	0,579	0,137	0,719	0,059	0,460	0,279
128Q-HTT (AUTEN-67)	2	0,345	0,086	0,461	0,269	0,429	0,015

F12. táblázat. Az AUTEN-99 kismolekula hatásának vizsgálata *Drosophila* HD modellben (35. ábra). A relatív p62-es fehérjeszintek nem vethetők össze a relatív Atg8a-s fehérjeszintekkel.

Genotípus-Kezelés	Ismétlések száma	Átlagos relatív fehérjeszint		
		p62	Atg8a-I	Atg8a-II
128Q-HTT (DMSO)	1	1,000	1,000	0,488
128Q-HTT (AUTEN-67)	1	0,654	2,074	4,529

11. Köszönetnyilvánítás

Először is köszönettel tartozom témavezetőmnek, professzor Vellai Tibornak minden segítségéért a kutatásban, a cikkek és doktori disszertációm megírásában és nem utolsósorban, hogy biztosította kutatásaim anyagi feltételeit is. Rengeteget tanultam tőle a kutatásról és a tudományos életről.

Különös köszönet azoknak a munkatársaknak (a Vellai laborban és más laborokban), akik közvetlenül segítettek doktori munkámat és a cikkek megjelenését. Bár a disszertációm a szokásoknak megfelelően egyes szám első személyben írtam meg, sokkal jobban megfelelne a valóságnak, ha többes szám első személyben fogalmaztam volna, mert szinte nincs olyan kísérletsor, amiben nem csapatként dolgoztunk volna együtt.

A teljesség igénye nélkül emelnék ki pár embert név szerint is:

Barna Jánost, aki továbbra is elviselte kérdéseim özönét és mindig lehetett vele együtt gondolkodni

Billes Viktort, állandó lektoromat és szakmai tanácsadómat bármilyen kérdésben

Fazekas Dávidot, elektronikus munkaeszközeim életbetartóját

Kosztelnik Mónikát, aki éveken át legközvetlenebb munkatársam volt fő témámban

Kovács Tibort, aki jelentősen hozzájárult, hogy megismerkedhettem még egy modellszervezettel

Kutnyánszky Verát, aki először mesélt nekem a *C. elegans* idegrendszeréről

Köszönöm a labor és a tanszék összes jelenlegi és korábbi dolgozójának, hogy bármilyen problémával fordultam hozzájuk mindig segítőkészek voltak és hogy még a nehéz helyzetekben is lehetett velük nevetni.

Köszönöm barátaimnak, hogy velem voltak a jó és kevésbé jó időkben is a doktori képzésem alatt.

Végül, de nem utolsó sorban szüleimnek, akik végig támogattak tanulmányaim során, pedig nem volt rövid időszak. Nélkük nem jutottam volna el idáig.

ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Hotzi Bernadette

MTMT-azonosító: 10050969

A doktori értekezés címe és alcíme: Az öregedési folyamat és idegi funkciók ivarspecifikus szabályozása genetikai modellszervezetekben

DOI-azonosító⁴⁶: 10.15476/ELTE.2019.106

A doktori iskola neve: ELTE TTK Biológia Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program

A témavezető neve és tudományos fokozata: Prof. Vellai Tibor, DSc

A témavezető munkahelye: ELTE TTK Genetikai Tsz.

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatal Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

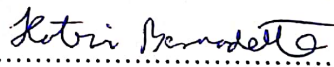
2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2019.05.21.



a doktori értekezés szerzőjének aláírása

*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet